

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Lardinois, Fanny

Promoteur(s) : Legrand, Sylvie

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/12481>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Université de Liège

Faculté de médecine

Département des sciences biomédicales et précliniques



GIGA – Infection, Immunity & Inflammation

Laboratoire d'immuno-métabolisme et nutrition

Promoteur : Sylvie LEGRAND

Co-promoteur : Chloé WILKIN

Impact de l'obésité et de l'intolérance au glucose sur l'interaction entre les cellules T Natural Killer invariantes et les monocytes

Fanny LARDINOIS

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Master en Sciences Biomédicales

Année académique 2020-2021

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je tiens à témoigner mes plus sincères remerciements à toute personne ayant contribué et aidé, de près ou de loin, à l'élaboration de mon mémoire.

Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements les plus sincères remerciements à ma promotrice, Dr. Sylvie Legrand. Je tenais à vous remercier de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir laissée rejoindre votre équipe. De m'avoir encadrée et conseillée durant tout ce mémoire. Je tenais à remercier également ma co-promotrice, Chloé Wilkin, qui m'a enseigné avec une clarté et une patience sans faille. Mais également, de m'avoir encadrée, soutenue et égayé toutes ces journées. Je tiens à remercier aussi Margaux Iovino pour sa bonne humeur mais aussi pour m'avoir soutenue et écoutée dans mes moments de doute.

Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide incommensurable du Service de diabétologie, nutrition et maladies métaboliques du CHU de Liège dont leur aide a permis de faire avancer ce projet. Je souhaite tout particulièrement remercier Danusia Juszczak pour sa disponibilité afin d'effectuer de nombreux prélèvements sanguins. Un tout grand merci à Marjorie Fadeur pour nous avoir épaulés et aidés à mettre sur pied cette étude clinique de patient. Je tiens à remercier toutes les autres personnes de service pour nous avoir aidés lors de l'initiation de cette cohorte, ainsi que tous les patients volontaires pour avoir donné de leur temps afin que ce travail aboutisse. Je remercie également Céline Vanwinge de la plateforme d'imagerie cellulaire et de cytométrie, pour son aide lors de l'utilisation du cytomètre.

Je désire remercier également tous les membres du laboratoire de virologie ainsi que les membres du laboratoire d'expression des gènes et cancer pour m'avoir accueillie, pour leur bonne humeur, pour l'ambiance. Merci de m'avoir écoutée et conseillée dans les bons moments comme les « mauvais » de ce mémoire. Merci également à Cédric Lassence pour son écoute et son aide.

Pour terminer, je voulais remercier ma famille pour m'avoir encouragée jusqu'à la fin de ce mémoire, ainsi que tout au long de mes années d'études. Je souhaite tout particulièrement remercier mon père ainsi que mon beau-père pour leur implication dans la rédaction de mon mémoire. Enfin, je ne peux terminer sans remercier Briec, pour sa patience et son soutien indéfectible.

Table des matières

Introduction	
1. Obésité.....	1
1.1 Définition et prévalence	1
1.2 Syndrome métabolique.....	1
1.3 Comorbidités	2
1.3.1 Intolérance au glucose et diabète de type 2.....	2
1.3.2 Cancers liés à l'obésité	3
1.4 Inflammation associée à l'obésité	4
1.5 Baisse de l'immunité	5
2. Cellule iNKT	5
2.1 Informations générales	5
2.2 Activation des cellules iNKT	6
2.3 Sous-populations	8
2.4 Rôles.....	9
2.5 Maladies infectieuses, auto-immunes, cancers.....	9
2.5.1 Infections bactériennes	9
2.5.2 Maladies auto-immunes	10
2.5.3 Cancer.....	11
2.6 Obésité et cellules iNKT	12
3. Monocyte.....	13
3.1 Généralités.....	13
3.2 Sous populations	13
3.3 Fonctions	14
3.4 Obésité et monocytes	14
4. CD1d	15
4.1 Chargement des lipides sur le CD1d	15
Hypothèse(s) de travail, objectifs poursuivis et stratégie utilisée pour atteindre ces objectifs ...	
Matériel et méthodes	
1. Matériel	18
1.1 Participants	18
1.2 Solutions.....	18
2. Méthodes	19
2.1 Collection des données, du sang et du plasma.....	19
2.2 Extraction des PBMCs.....	20

2.3	Congélation des PBMCs.....	20
2.4	Cytométrie en flux.....	21
2.4.1	Panels extracellulaires	22
2.4.2	Panel intracellulaire.....	22
2.4.3	Compensation et titration des anticorps	23
2.5	Cohorte	24
2.5.1	Caractérisation des cellules iNKT et des monocytes	24
	<i>Comptage des cellules iNKT et analyses marqueurs membranaires des cellules iNKT et des monocytes</i>	<i>24</i>
2.6	Analyses graphiques et statistiques	25
	Résultats	
1.	Mises au point des expériences de cytométrie en flux	26
1.1	Nouveau panel d'anticorps pour marqueurs membranaires de cellules iNKT (panel II) 26l	
1.1.1	Compensation.....	26
1.1.2	Titration.....	26
1.1.3	FMO	27
1.1.4	Stratégie de gating	27
1.2	Panel des monocytes	28
1.2.1	Compensation.....	28
1.2.2	Titration.....	28
1.2.3	FMO	28
1.2.4	Stratégie de gating	29
1.3	Panel d'anticorps pour marqueurs intracellulaires des cellules iNKT	29
1.3.1	Compensation.....	29
1.3.2	Titration.....	29
1.3.3	FMO	30
1.3.4	Stratégie de gating	30
1.4	Autres stratégies de gating	31
1.4.1	Stratégie de gating du panel I des cellules iNKT	31
1.4.2	Stratégie de gating du panel de prolifération.....	31
2.	Caractérisation des cellules iNKT des patients obèses avec ou sans intolérance au glucose.....	32
2.1	Caractéristiques anthropométriques, cliniques et biologiques des populations étudiées 32	
2.2	Caractérisation des cellules iNKT périphériques	32
2.2.1	Fréquence des cellules iNKT	33

2.2.2	Caractérisation des sous-populations de cellules iNKT	33
2.2.3	Phénotypage des cellules iNKT totales et des sous-populations de cellules iNKT	33
2.2.4	Évaluation de l'activité des cellules iNKT	35
	<i>Analyse de la capacité de prolifération des cellules iNKT</i>	<i>35</i>
	<i>Analyse de la production de cytokines suite à une stimulation des cellules iNKT.....</i>	<i>35</i>
3.	Caractérisation des monocytes	36
3.1	Caractérisation des sous-populations monocytaires	36
3.2	Expression du CD1d.....	37
	Discussion et Conclusion	38
	Bibliographie.....	45

Liste des abréviations :

α -GalCer : α -Galactosylcéramide

ABSI : A Body Shape Index (un indice de forme corporelle)

AP : Protéines Adaptatrices

ApoE : Apolipoprotéine E

BAI : Body Adiposity Index

CD40L : Ligand du CD40

CM : Monocyte classique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CRP : C-reactive protein

DN : Double négative

DT1 : Diabète de Type I

DT2 : Diabète de Type II

FGF21 : Facteur de croissance 21 des fibroblastes

FMO : Fluorescence Minus One

FSC : Forward-Scattered light

GR : Globule Rouge

HbA1c : Hémoglobine glyquée

IFN- γ : Interféron- γ

IGb3 : Isoglobotrihexosylceramide

IL : Interleukine

IM : Monocyte intermédiaire

IMC : Indice de Masse Corporelle

iNKT : invariant Natural Killer T

LB : Lymphocyte B

LDLR : Récepteur des lipoprotéines de basse densité

LT : Lymphocyte T

LTreg : Lymphocyte T régulateur

MFI : Médiane de fluorescence

MIP-2 : Protéine inflammatoire macrophagique 2

MTTP : microsomal triglyceride transport protein

NK : Natural Killer
NCM : Monocyte Non-Classique
NKT : Natural Killer T
OBNG : Obèse normo-glycémique
OBIG : Obèse intolérant au glucose
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Pression Artérielle
PBMCs : Cellule mononucléée sanguine périphérique
PIM4 : Phosphatidylinositolmannoside
PMA : phorbol 12-myristate-13-acetate
RE : Réticulum Endoplasmique
RI : Réponse Immunitaire
ROS : Espèces réactives à l'oxygène
SD : Ecart-type
SI : Staining Index
SSC : Side-Scattered light
SMet : Syndrome Métabolique
TA : Tissu Adipeux
TCR : Récepteur des Cellules T
TLR : Toll-Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
WAT : White Adipose Tissue (tissu adipeux blanc)

Introduction

Classification	Indice de masse corporelle
Insuffisance pondérale	$< 18,5$
Poids normal	$18,5 - 24,9$
Surpoids	$25 - 29,9$
Obésité	≥ 30

Tableau 1 : classification en fonction de l'indice de masse corporelle.

1. Obésité

1.1 Définition et prévalence

L'obésité est définie par l'OMS comme étant « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé »¹. L'obésité est désormais considérée comme étant une épidémie mondiale. Sa prévalence augmentant d'année en année, fait de l'obésité un problème de santé publique majeur^{2,3}. Selon les données de l'OMS, il a été estimé qu'en 2016 plus de 650 millions d'adultes étaient obèses ce qui représente environ 13 % de la population adulte mondiale¹. De plus, depuis 1975, le taux de personnes obèses a triplé, des scientifiques estiment qu'en 2030 plus de 51 % de la population mondiale sera en surpoids ou obèse³.

Généralement, une personne est classée comme étant obèse en fonction de son indice de masse corporelle (IMC). L'IMC est calculé sur base de la formule suivante : $\frac{\text{Poids (kg)}}{(\text{Taille (m)})^2}$ (tableau 1)¹⁻³.

Cependant, l'IMC présente des limitations. En effet, cet indice n'est pas capable de faire la distinction entre la masse grasseuse et la masse musculaire. La masse grasseuse a un impact sur la mortalité de l'individu, alors que la masse musculaire est associée, au contraire, à un faible risque de décès prématuré. De plus, les différentes localisations grasseuses ne sont pas considérées par l'IMC alors qu'elles peuvent avoir un impact sur la santé des individus^{4,5}. Par rapport aux autres dépôts adipeux, l'obésité abdominale est reconnue comme étant plus étroitement associée aux maladies cardiovasculaires et à d'autres maladies chroniques telles que des maladies chroniques du foie et le diabète de type 2 (DT2)⁶.

L'obésité est une maladie multifactorielle, il est donc compliqué de lui associer une seule et unique cause. De nombreux facteurs de risques associés à l'obésité ont été découverts, tels que les facteurs environnementaux (comme l'augmentation de la consommation de sucre et de l'accessibilité à de la nourriture hautement énergétique^{3,6}), la génétique, l'âge, le microbiote intestinal, les régimes alimentaires³. Toutefois, la cause principale conduisant à cette accumulation de graisses est l'installation d'un déséquilibre énergétique entre les calories ingérées et les calories dépensées dû au régime alimentaire¹.

1.2 Syndrome métabolique

L'obésité est associée à de nombreux facteurs de risque métabolique regroupés sous le même nom : le syndrome métabolique (SMet)⁷. Il est également connu sous le nom de syndrome X, syndrome de la résistance à l'insuline ou syndrome de l'obésité. Pour poser le

Critères	Valeurs seuil pour le diagnostic du SMet
Pression artérielle (PA)	≥130 mmHg PA systolique ou ≥85 mmHg PA diastolique
Triglycérides	≥150 mg/dl (≥1,7 mmol/L)
HDL cholestérol	<40 mg/dl chez les hommes ou <50 mg/dl chez les femmes
Tour de taille (cm)	≥102 cm pour les hommes ou ≥88 cm chez les femmes
Glycémie à jeun	≥100 mg/dl

Tableau 2 : listes des différents critères pour poser le diagnostic du syndrome métabolique.

diagnostic de ce syndrome, il faut au moins présenter 3 des 5 critères détaillés dans le tableau 2⁸⁻¹⁰.

Le SMet augmente les risques de développer de nombreux problèmes de santé comme la résistance à l'insuline, le DT2, une stéatose hépatique, de l'athérosclérose, des maladies des voies respiratoires et certains cancers¹¹.

1.3 Comorbidités

La perturbation de la balance énergétique amenant à un gain de poids cause également des perturbations métaboliques conduisant ainsi un stress et une dysfonction tissulaire¹². Ce qui conduirait chez les patients obèses à un risque accru de morbidité due à de nombreuses maladies métaboliques¹³. On retrouve dans ces maladies métaboliques les maladies cardiovasculaires, les maladies du foie, le DT2, arthrose et certains types de cancers^{1-3,14}. Par ailleurs, l'obésité semble également induire une augmentation de la mortalité due aux cancers, représentant 14 à 20% des décès dûs aux cancers chez les personnes âgées de plus de 50 ans¹⁵. En plus de ces maladies métaboliques, l'obésité est associée à d'autres comorbidités comme la dyslipidémie, l'arthrose ou encore les apnées du sommeil¹⁶. Dans la suite de ce mémoire, je me focaliserai préférentiellement sur l'intolérance au glucose, le DT2 et les cancers associés à l'obésité.

1.3.1 Intolérance au glucose et diabète de type 2

L'insuline est une hormone qui a pour rôle de maintenir l'homéostasie du glucose et des lipides. Elle est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas en fonction du taux de glucose et d'acide gras présent dans la circulation sanguine. Lorsqu'un individu sain ingère un repas, le taux de glucose et de lipide dans le sang s'élève, ce qui provoque la synthèse d'insuline par les cellules β . L'insuline va alors pouvoir se lier à son récepteur cellulaire qui est surtout présent en grande quantité au niveau des muscles squelettiques, du tissu adipeux (TA) et du foie. Cette liaison permet alors l'entrée du glucose dans ces cellules pour son intervention dans le métabolisme énergétique, la synthèse d'acides gras et de protéines.

En revanche, chez un individu obèse un phénomène de résistance à l'insuline peut s'installer au niveau de ces tissus. L'insuline ne sait plus se lier au niveau de ses récepteurs, en conséquence, les cellules ne parviennent plus à utiliser le glucose. Ainsi, le taux de glucose s'élève dans la circulation sanguine ce qui pousse les cellules β à libérer d'avantage d'insuline. Les cellules β parviennent à compenser, en partie, cette élévation du taux de glucose. Ce stade correspond au développement du prédiabète aussi appelé intolérance au glucose. Par la suite, les cellules arrivent à un épuisement et deviennent dysfonctionnelles en ne parvenant plus à

	Glycémie à jeun	HbA1c
Normal	< 100 mg/dl	< 5,7%
Prédiabète	100 mg/dl \leq glycémie < 126	5,7% \leq HbA1c < 6,5%
Diabète	\geq 126 mg/dl	\geq 6,5%

Tableau 3 : valeurs de références des tests de glycémie à jeun et d'hémoglobine glyquée.

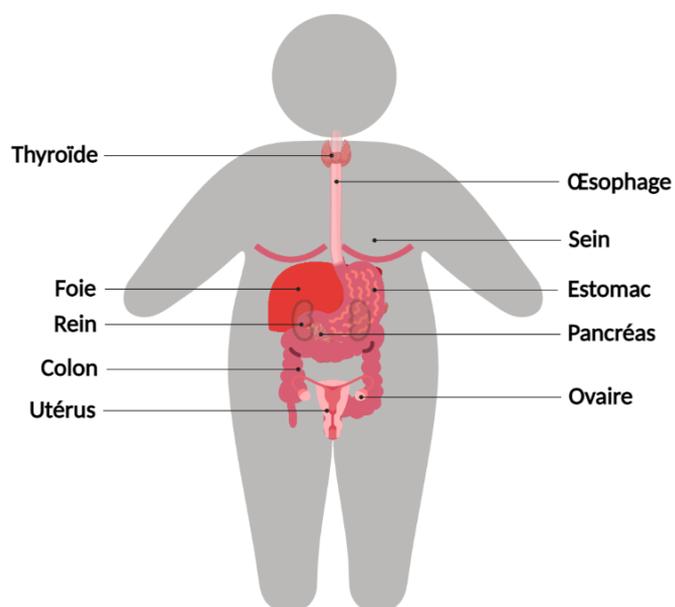


Figure 1 : illustration de 10 cancers associés à l'obésité.

produire suffisamment d'insuline, causant ainsi une augmentation rapide de la glycémie. A partir de là, on parle de DT2³.

Le DT2 est une maladie métabolique complexe, qui est caractérisée par une hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et une dysfonction des cellules β du pancréas, où une perte cellulaire, qui peut monter jusqu'à 50%, peut être observée lors du diagnostic. Cette maladie est associée à de nombreuses maladies cardiovasculaires et complications microvasculaires comme des rétinopathies, néphropathies et neuropathies¹⁷.

Tout comme le DT2, le prédiabète est un facteur de risque pour de nombreuses maladies. Outre le risque de développer le DT2, il est également associé à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires et augmente la mortalité toutes causes confondues^{18,19}. D'autres maladies y sont aussi associées comme des dysfonctionnements cognitifs, des anomalies de la pression artérielle, des apnées obstructives du sommeil et des stéatoses hépatiques²⁰.

Il existe 2 méthodes principales pour diagnostiquer un prédiabète ou un DT2 :

1. Test de glycémie à jeun : le patient ne doit pas consommer de nourriture ou de boisson (sauf de l'eau) durant au moins 8 heures avant la mesure sanguine de sa glycémie.
2. L'hémoglobine glyquée (HbA1c) est dosée pour estimer la fluctuation de la glycémie au cours des 3 derniers mois du patient.

Pour chacun de ces tests, des valeurs de référence ont été établies pour pouvoir classer les patients dans les 3 catégories suivantes : normo-glycémique, prédiabétique et diabétique (tableau 3)²¹.

1.3.2 Cancers liés à l'obésité

Comme énoncé précédemment, l'obésité augmente sérieusement les risques de développer certains cancers. Il a d'ailleurs été estimé que 20 % de tous les cancers sont causés par un excès de poids. L'apparition de ces cancers est majoritairement due aux anomalies métaboliques et hormonales retrouvées dans l'obésité²². De nombreux cancers sont associés à l'obésité, comme le cancer de la thyroïde, de l'œsophage, du sein, de l'estomac, du foie, du pancréas, des reins, des ovaires, du colon et du col de l'utérus (figure 1)¹⁵. Un des mécanismes expliquant la progression de nombreux cancers est lié à l'excès de glucose et de lipide, qui crée un excès de substrat pour la croissance des cellules cancéreuses en permettant la production d'ATP et la génération de lipides membranaires. L'excès de glucose et de lipide promeut, in fine, la progression tumorale et une croissance cellulaire incontrôlée²³.

1.4 Inflammation associée à l'obésité

L'inflammation est une réponse physiologique induite par des stimuli ou des conditions pouvant nuire à l'intégrité fonctionnelle du corps, comme des infections ou des lésions tissulaires²⁴. Une réponse inflammatoire aiguë est souvent caractérisée par une arrivée rapide des granulocytes sanguins, généralement des neutrophiles, suivi par des monocytes mûrissant en macrophages inflammatoires. Une réponse inflammatoire aiguë réussie résulte en une résolution de l'infection et/ou la réparation du tissu endommagé²⁵. Par contre, dans le cas où l'état d'inflammation se prolonge, cet état peut être néfaste pour l'individu comme dans le cadre de maladies métaboliques¹¹.

Dans le cadre de l'obésité, une inflammation chronique dite de « bas grade » est observée²⁶. Cette inflammation est caractérisée par une production anormale de cytokines, une augmentation de médiateurs pro-inflammatoires qui activent une série de voies de signalisation inflammatoire (comme la voie NF- κ B et la voie JNK)^{11,27}. Dans l'obésité, le TA, le foie, les muscles squelettiques et le pancréas sont des sites d'inflammation au sein desquels une infiltration de macrophages de type pro-inflammatoire est observée. Ces cellules vont elles-mêmes produire des cytokines pro-inflammatoires, tels que le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-1 β (IL-1 β)²⁸. Ainsi, on peut observer au sein de ces tissus, un déséquilibre penchant vers un profil pro-inflammatoire, ce qui est une cause de cette inflammation chronique^{15,28}. Ce profil inflammatoire n'est pas seulement dû à un switch phénotypique des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire, d'autres paramètres rentrent en jeu. Le nombre de plusieurs autres cellules immunitaires est également modifié. L'obésité induit une diminution du nombre de lymphocytes T (LT) anti-inflammatoire (LT régulateur et LT helper 2) et au contraire, une augmentation du nombre de LT cytotoxique (CD8+), pro-inflammatoire (LT helper 1 et 17)²⁸. Il existe encore d'autres mécanismes expliquant le développement de cette inflammation chronique comme l'hypertrophie des adipocytes²⁹, la dysfonction mitochondriale ou encore le stress du réticulum endoplasmique¹⁵.

Ce phénotype inflammatoire contribue au développement de la résistance à l'insuline, dyslipidémie et hyperglycémie. Les mécanismes menant à la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie (DT2) ont été expliqués précédemment. Concernant la dyslipidémie, elle proviendrait de l'expansion excessive de graisse qui mène à une réponse pro-inflammatoire qui stimule la sécrétion d'acides gras libres et la lipolyse. Les acides gras libres s'accumulent dans de nombreux tissus, y entraînant, par exemple, une lipotoxicité et de l'inflammation. Dans le

foie, les dépôts d'acides gras libres peuvent conduire à une altération des triglycérides hépatiques et du métabolisme du cholestérol donnant lieu à une dyslipidémie¹⁵.

1.5 Baisse de l'immunité

Il a été démontré que l'obésité affectait de manière négative l'immunité, ce qui pourrait expliquer, entre autre, qu'il existe un taux d'échec de vaccination plus élevé, ainsi que de nombreuses complications à la suite d'infections¹². Par exemple, dans le cadre d'une infection au SARS-CoV-2, cette altération de l'immunité augmente le risque de développer la covid-19 et d'avoir de plus grandes complications à la suite de cette maladie. De plus, chez une personne obèse les réponses lymphocytaires B et T voient leur efficacité réduite, ce qui augmente la probabilité et compromet la résolution de la maladie³⁰.

Le développement d'une immunodéficiences dans l'obésité est lié à diverses altérations au niveau des niveaux d'hormones circulantes et de nutriments. Chez un individu obèse, la baisse des niveaux d'adiponectines et l'accumulation de gouttelettes lipidiques au sein des cellules Natural Killer (NK) impactent leur fonction cytotoxique ainsi que la production de cytokines par des cellules appartenant à la lignée des myéloïdes^{31,32}. Cette baisse d'immunité est également associée à une altération dans l'architecture et l'intégrité des tissus lymphoïdes, accompagnée d'une altération dans la répartition des populations de leucocytes et de l'activité lymphocytaires. En effet, l'intégrité de l'architecture des tissus immunitaires est essentielle à la génération et maturation des leucocytes. Chez les personnes obèses, il est observé une augmentation de la contenance en graisse dans les tissus lymphoïdes, ce qui engendrerait plus de leucocytes avec un phénotype pro-inflammatoire¹². Par ailleurs, une augmentation de nombre de macrophages, neutrophiles, lymphocytes T et B et mastocytes est observée dans le TA de personne obèse. Ainsi, une expansion et une activation aberrante dans le TA des cellules de la réponse immunitaire (RI) sont observées, ayant pour conséquence une augmentation de l'inflammation et une dysfonction du TA. Ce mécanisme est également une des causes, menant au développement de phénomène de résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et de l'athérosclérose³³.

2. Cellule iNKT

2.1 Informations générales

Les cellules invariantes Natural Killer T (iNKT) sont définies comme étant une population non conventionnelle de la lignée des LT exprimant des récepteurs caractéristiques de la lignée des LT (CD3) et de la lignée des cellules NK (CD161, CD56). Elles possèdent un

récepteur de cellule T (TCR) semi-invariant qui leur permet de reconnaître des antigènes lipidiques étrangers ou du sois³⁴⁻³⁸. Ce TCR subit des recombinaisons somatiques, chez la souris ce récepteur comprend une chaîne $V\alpha 14J\alpha 18$ invariante qui va se paier avec un répertoire limité de chaîne $V\beta$: $V\beta 2$, $V\beta 7$, $V\beta 8.1$, $V\beta 8.2$ ou $V\beta 8.3$. Ce répertoire existe également chez l'Homme, où il est encore plus limité, dans lequel la chaîne $V\alpha 24J\alpha 18$ est presque toujours appariée avec la chaîne $V\beta 11$ ^{35,36}.

Concernant leur distribution tissulaire, chez la souris les cellules iNKT sont fortement enrichies dans la rate et le foie, où elles représentent, respectivement, environ 1-2 % et plus de 20-30% des LT, dans le sang et les ganglions lymphatiques, elles comptent pour environ 0,5 % des LT. Chez l'Homme, la distribution tissulaire de ce type cellulaire est environ 10 fois moins abondante^{34,35,38}. À titre d'exemple, les cellules iNKT ne représentent que 3 à 5 % des LT du foie³⁸ et dans le sang périphérique humain, leur taux varie en moyenne de 0,1 % à 0,2 % des LT en fonction des individus³⁵.

Les ligands du TCR de ces cellules iNKT sont des antigènes lipidiques présentés par le CD1d. De nombreux ligands ont été découverts, mais un seul ligand est actuellement reconnu par le monde scientifique, il s'agit de l' α -galactosylcéramide (α -GalCer). Ce lipide a été identifié dans un échantillon d'éponge marine (*Agelas mauritanus*), il serait originaire non pas de l'éponge marine, mais d'une bactérie (*Novosphingobium bacteria*) présente dans celle-ci. Concernant les autres ligands, selon des études utilisant l'immunoprécipitation du CD1d, il a été suggéré que les ligands lipidiques du TCR des cellules iNKT seraient en majorité des glycosphingolipides ou des phospholipides membranaires. Certaines études ont suggéré que l'isoglobotrihexosylceramide (iGb3) serait un potentiel antigène lipidique du sois. Ou encore que, par exemple, le phosphatidylinositolmannoside (PIM4) qui est un phospholipide mycobactérien membranaire serait un antigène lipidique microbien^{34,35}. Mais tous ces antigènes potentiels sont encore au stade de débat³⁴.

2.2 Activation des cellules iNKT

Pour mener à l'activation des cellules iNKT, deux signaux sont le plus souvent impliqués. Le premier provenant de l'activation du TCR des cellules iNKT par le complexe lipide-CD1d et le deuxième est un signal impliquant des cytokines³⁵. Les cellules iNKT peuvent être activées de trois manières différentes. Les deux premières dépendent du TCR alors que la troisième n'en dépend pas :

1. Les cellules iNKT peuvent être activées directement par la reconnaissance directe, via leur TCR, d'un antigène (glyco-) lipidiques **exogène** présenté par une molécule CD1d à la

surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) activées. Ces CPA peuvent être des cellules hématopoïétiques comme des cellules dendritiques, des monocytes et des lymphocytes B (LB) ou des cellules non hématopoïétiques telles que des hépatocytes et adipocytes³⁹. Toutefois, les CPA produisent également des cytokines qui fournissent un second signal activateur ayant cependant un faible impact sur l'activation des cellules iNKT^{35,40} (figure 2A). Ce signal est considéré comme un signal TCR fort capable d'activer presque seul les cellules iNKT. Une fois activées, les cellules iNKT en réponse peuvent sécréter à la fois des cytokines de type pro- et anti-inflammatoire (interféron (IFN)- γ et IL-4, respectivement).

2. Les cellules iNKT peuvent également être activées en l'absence d'antigènes, comme dans le cas d'une infections virales⁴¹. Dans ce cas, les pathogènes vont activer les CPA via leur Toll-Like récepteur (TLR). A la suite de cette activation, les CPA vont produire des cytokines et présenter des antigènes endogènes du sois ou un antigène microbien de faible affinité pour stimuler les cellules iNKT^{35,36}. Contrairement à la précédente, cette activation est dominée par le **signal fort provenant des cytokines**, mais l'activation des cellules iNKT requiert toujours un **faible signal TCR** provenant du complexe lipide-CD1d pour obtenir une réponse robuste de la part des cellules iNKT (figure 2B). L'activation des cellules iNKT est donc considérée comme indirecte. Dans ce cas, les cellules iNKT vont alors sécréter préférentiellement des cytokines pro-inflammatoire). Généralement, les cellules iNKT expriment des récepteurs pour et peuvent être activées par les cytokines suivantes : l'IL-12, IL-18, IL-23 et IL-25³⁵.
3. Dans certains cas, les cellules iNKT peuvent être activées par une stimulation venant **uniquement des cytokines**⁴². Comme dans le cas précédent, il y a donc une grande production de cytokines. En revanche il n'y a pas de présentation d'antigène. Dans ce cas également, les cellules iNKT vont alors sécréter préférentiellement des cytokines pro-inflammatoires (figure 2C). Par exemple, certaines infections virales et bactériennes (comme des infections au cytomégalovirus⁴³) peuvent mener à une production suffisante d'IL-12 par les CPA, activant les cellules iNKT même en absence de la costimulation du TCR par le CD1d³⁵. De plus, dans ce type d'activation les cellules iNKT peuvent être stimulées par leur récepteur appartenant à la lignée de cellules NK et par des molécules dites de stress exprimés par des CPA. Par exemple, NKG2D peut reconnaître de nombreux ligands et induire l'activation des cellules iNKT pour qu'elles répondent à l'inflammation même en l'absence d'un antigène lipidique spécifique activateur^{35,39}.

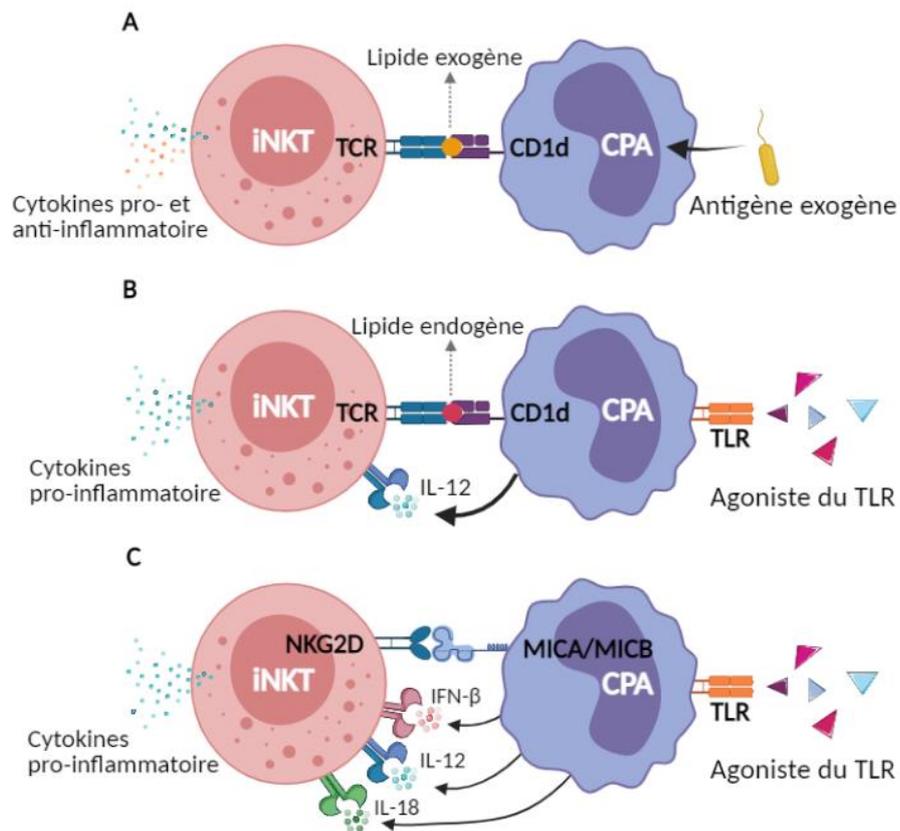


Figure 2 : adaptée à partir de “NKT cells and the regulation of intestinal immunity: a two-way street”. Les 3 voies d’activation des cellules iNKT. (A) Activation directe des cellules iNKT médiées par un signal TCR fort. (B) Activation indirecte des cellules iNKT médiée par un faible signal TCR et un signal cytokine fort. (C) Activation indirecte des cellules iNKT médiée par des cytokines et par leur récepteur de la lignée NK.

Par ailleurs, en fonction du type d'activation et du type de CPA présentant l'antigène, les cellules iNKT ont la capacité de moduler leur fonction effectrice par la modulation des profils d'expression de cytokines. Leurs propriétés pro- et anti-inflammatoires vont varier en fonction de leur mode d'activation, du profil de cytokines contenu dans l'environnement, de la puissance et de la durée de l'activation³⁶. Lors d'une activation par un antigène lipidique puissant (activation dite classique), les cellules iNKT produisent à la fois des cytokines de type Th1 et de Th2 comme de IFN- γ et de l'IL-4, respectivement. Tandis que dans le cas d'une activation médiée par une forte libération de cytokine (activation dite indirecte) les cellules iNKT sécréteront majoritairement de l'IFN- γ (figure 2)⁴⁴.

Les cellules iNKT peuvent être activées par la présentation d'un antigène lipidique, tel que l' α -GalCer, par des cellules dendritiques ou CPA³⁶. A la suite de cette activation, une augmentation de l'expression de marqueurs d'activation est observée. On retrouve, par exemple, une augmentation de l'expression du CD69 qui est un marqueur d'activation précoce (2-3h) et du CD25 qui est un marqueur d'activation tardif (24-72h)⁴⁵. De plus, cette activation est rapidement accompagnée par une grande production de cytokines de type pro-inflammatoire et anti-inflammatoire³⁶.

2.3 Sous-populations

Plusieurs sous-populations de cellules iNKT phénotypiquement et fonctionnellement distinctes ont été identifiées. Chez l'homme, les cellules iNKT peuvent être différenciées grâce à l'expression ou non des marqueurs cellulaires CD4 et CD8. Les cellules iNKT peuvent ainsi être subdivisées en 3 sous-populations distinctes :

- (1) CD4+/CD8-
- (2) CD4-/CD8+
- (3) Double négative (CD4-/CD8-)

Ces sous-populations tendent à avoir des fonctions différentes. Les cellules iNKT tendent, en fonction de leur appartenance à une sous-population, à sécréter un type de cytokine de manière préférentielle par rapport aux autres sous-populations. Les cellules CD4+ sembleraient sécréter de manière préférentielle des cytokines de type Th2, comme l'IL-4^{35,46}. Par contre, les cellules CD8+ pourraient montrer une capacité plus importante à produire de l'IFN- γ et serait la sous-population la plus cytotoxique^{35,38,46}. Concernant les cellules iNKT doubles négatives (DN), il semblerait qu'elles aient tendance à sécréter plus d'IFN- γ et d'exercer une fonction plutôt cytotoxique comme les CD8+, mais de moindre importance³⁸.

Néanmoins, toutes les sous-populations peuvent sécréter les deux types de cytokines Th1 et Th2.

2.4 Rôles

La stimulation des cellules iNKT par leur TCR mène à une sécrétion très rapide et importante de cytokine (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IFN- γ , TFN- α , GM-CSF, et des chimiokines, RANTES, éotaxine, MIP-1 α et MIP-1 β) et à l'acquisition d'une activité cytotoxique médiée par Fas/FasL et via la libération de perforine et granzyme B⁴⁷. Cette réaction va permettre de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative et ainsi contrôler une infection³⁶.

Les cellules iNKT joueraient un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et protègent contre l'inflammation trop importante des tissus comme le tissu adipeux et le foie. Par exemple, dans le tissu adipeux, un mécanisme suggère l'implication des cellules iNKT dans le « brunissement » du tissu adipeux blanc (WAT). L'activation des cellules iNKT mène à la production du facteur de croissance 21 des fibroblastes (FGF21) par le WAT et cette voie du FGF21 médiée par les iNKT conduirait à une perte de poids³⁶.

2.5 Maladies infectieuses, auto-immunes, cancers

Les cellules iNKT sont impliquées dans une large variété de maladies telles que les maladies infectieuses, les maladies auto-immunes, le lupus, l'asthme, certains cancers³⁴. En outre, une diminution du nombre de cellules iNKT dans le sang périphérique est associée à de nombreuses maladies inflammatoires, auto-immunes ou cancers. En revanche, dans de rares pathologies comme la drépanocytose, une augmentation de la population de cellules iNKT dans le sang périphérique a été décelée³⁵.

Les cellules iNKT sont également impliquées dans des infections, où elles ont un rôle protecteur face aux bactéries, virus, protozoaires. A contrario, lors de certaines infections ou d'inflammation chronique, elles peuvent avoir un rôle pathogénique en créant une tempête cytokines ce qui peut être délétère et causer de sérieux dommages tissulaires^{36,38}.

2.5.1 Infections bactériennes

Lors d'une infection microbienne, les cellules iNKT sont activées et vont produire des cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-17A et l'IL-4 ce qui va pouvoir provoquer une RI innée et permettre le recrutement des diverses cellules immunes. Comme des neutrophiles qui vont être recrutés par la production d'IFN- γ et d'IL-17A ou des cellules dendritiques qui sont stimulées par l'IFN- γ et l'IL-4 et grâce à l'interaction entre le ligand du CD40 (CD40L) et le CD40. Une

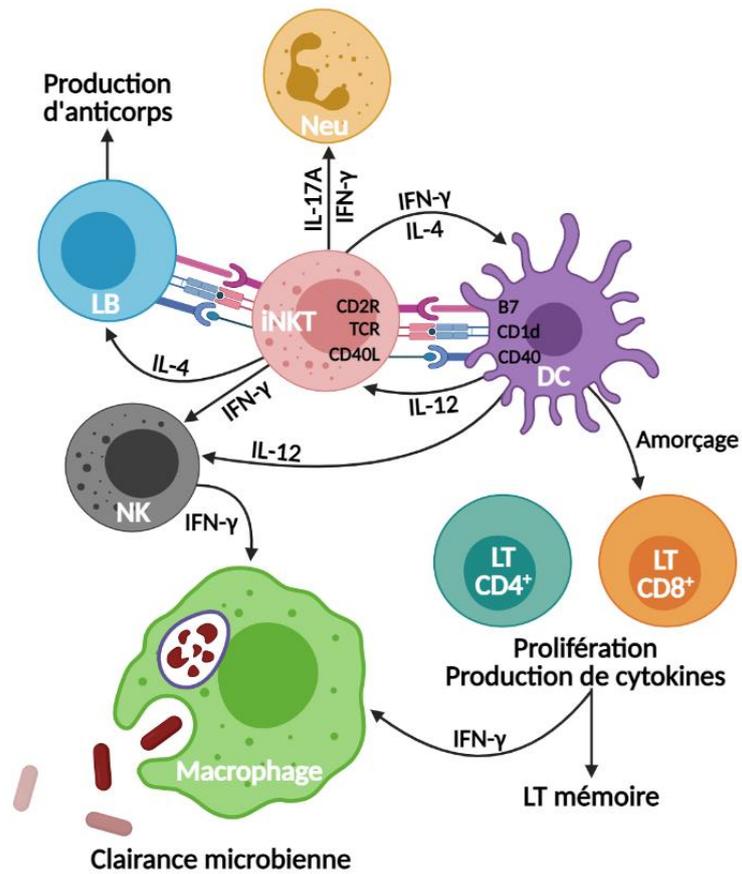


Figure 3 : adaptée à partir de « Functions of CD1d-Restricted Invariant Natural Killer T Cells in Antimicrobial Immunity and Potential Applications for Infection Control ». Interaction des cellules iNKT avec d'autres cellules immunitaires.

fois les cellules dendritiques activées, elles vont elle-même produire des cytokines comme l'IL-12. Ces cytokines vont à leur tour stimuler la production d'IFN- γ par des cellules iNKT. Ce qui va avoir comme impact d'engendrer la clairance microbienne par des macrophages qui viennent d'être eux-mêmes stimulés par les cytokines sécrétées par les cellules dendritiques. Les cellules iNKT vont avoir une autre action sur les cellules dendritiques, l'induction de leur maturation. Leur maturation va leur permettre d'activer les LT CD4+ et CD8+ pour entraîner la clairance des microbes et va en plus activer la différenciation des LT effecteurs. Ce qui va conférer une protection à long contre cette infection en stimulant la création de LT mémoire. De plus, les cellules iNKT vont fournir une « aide » aux LB à promouvoir la production d'anticorps (si l'antigène glycolipidique est présenté par les LB) (figure 3)⁴⁸.

Lors d'une infection au streptococcus pneumoniae, dans la phase précoce de l'infection les cellules iNKT contribuent au recrutement des neutrophiles et de la clairance bactérienne dans les poumons, en libérant des cytokines tels que le IFN- γ , TNF- α ou protéine inflammatoire macrophagique 2 (MIP-2)⁴⁹. Cependant, durant certaines infections microbiennes, les cellules iNKT peuvent jouer un rôle délétère en induisant l'inflammation ou en l'augmentant, causant une exacerbation de l'infection ou une maladie inflammatoire sévère aigue ou chronique⁵⁰. En revanche, de nombreuses études ont démontré que les glycolipides activant les cellules iNKT pouvaient être de très bon potentiel adjuvant dans des vaccins. Une étude a démontré qu'en immunisant des souris avec des antigènes malariques et de l' α -GalCer ceci permettait d'inhiber le développement des stades de la malaria dans le foie, de prévenir la parasitémie et était beaucoup plus efficace que l'utilisation d'antigène du paludisme seul⁵¹. Une autre étude a démontré que des souris immunisées avec des antigènes de la tuberculose combinée à de l' α -GalCer présentent une réponse spécifique à l'antigène par les LT CD4+ et CD8+ significativement plus forte qu'une immunisation l' α -GalCer. Ce qui permet d'observer chez ces souris, une charge bactérienne plus faible dans des organes tel que les poumons et la rate⁵².

2.5.2 Maladies auto-immunes

Chez les patients atteints de maladies auto-immunes ou dans des modèles expérimentaux d'auto-immunité, une diminution du nombre de cellules iNKT a été observée⁵³. Comme expliqué dans un paragraphe précédent, des cellules iNKT mènent à la régulation de nombreux autres types cellulaires. Ainsi, elles peuvent promouvoir ou supprimer la RI dans de nombreuses maladies. Chez un individu sain, elles permettent de supprimer l'auto-immunité si elle se déclare. En revanche, il a été démontré que chez des personnes prédisposées à développer de l'auto-immunité, les cellules iNKT étaient souvent présentes, mais en nombre réduit et

avaient un profil de production de cytokine défectueux, ce qui met en évidence indirectement le rôle protecteur de ces cellules⁵⁴.

Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune caractérisée par une destruction sélective des cellules β du pancréas⁵⁵. De nombreuses études ont démontré une diminution du nombre de cellules iNKT dans le DT1 et une perturbation de leur fonction. En effet, après leur stimulation, de faibles niveaux de cytokine sont seulement libérés⁵³. Actuellement, des études sont en cours, dans lesquelles l' α -GalCer est utilisé comme traitement pour le DT1 mais aussi pour d'autres maladies auto-immunes⁵⁴. Dans le cadre du DT1, l' α -GalCer permettrait d'augmenter le nombre de cellules iNKT CD4+ et donc d'augmenter la production d'IL-4. Il permettrait également de diminuer la production d'IL-17 par les iNKT doubles négatives et de promouvoir la conversion des LT naïfs autoréactifs vers des LT régulateur (LTreg)⁵⁵.

2.5.3 Cancer

Dans le cas des cancers, la fréquence et la fonction des cellules iNKT présentes dans la tumeur ou dans la circulation sanguine sont hautement corrélées avec la survie globale des patients atteints de cancers^{56,57}. Les cellules iNKT peuvent exercer des activités antitumorales, en vue de leur capacité à produire de larges quantités de cytokines qui vont moduler l'activité de nombreuses cellules immunitaires innée et adaptative. En plus de leur capacité à activer d'autres cellules immunes, les cellules iNKT peuvent exercer une fonction cytotoxique directement sur les cellules tumorales. Pour cela, ces dernières doivent exprimer le CD1d pour être reconnue par les cellules iNKT et sont tuées grâce à l'action de perforines et de granzyme B⁵⁸. De nombreux rôles indirects des cellules iNKT dans l'immunosurveillance ont été suggérés dans les cancers de la prostate, du neuroblastome, du mélanome, du colon, du poumon. Dans ces cancers, une diminution du nombre de cellules iNKT, un défaut de leur réponse suite à une stimulation, une diminution de la production d'IFN- γ et une augmentation de la production d'IL-4 sont observés. Ainsi, ces cellules semblent switcher vers un phénotype de type Th2⁵⁶.

En vue de ces données, des immunothérapies ciblant les cellules iNKT ont commencé à émerger. Comme dans le cadre des maladies auto-immunes, lors de tumeurs, l' α -GalCer peut être utilisé comme traitement pour stimuler l'activité antitumorale des cellules iNKT. Une étude clinique de phase I a administré de l' α -GalCer chez des patients ayant de différents types de tumeurs solides, telles que des mélanomes, des cancers de l'œsophage, du sein et du pancréas. Il a été observé une expansion des cellules iNKT chez quelques patients et une augmentation

des niveaux d'IFN- γ . Il a été observé chez plus d'un tiers des patients une progression stable de la maladie sans effets indésirables graves. Néanmoins, cette étude n'a pas mené à une étude de phase II en vue d'absence de réponse clinique et la faible fréquence des patients chez lesquels des signes d'activation immunologiques ont été observés⁵⁹. D'autres études ont été réalisées en utilisant également de l' α -GalCer qui est utilisé en combinaison avec des cellules immunes comme des cellules dendritiques. Toutefois, elles n'ont montré que des niveaux de réponse limitée, ces résultats restent tout de même prometteurs pour la suite et l'immunothérapie basée sur les cellules iNKT⁵⁸.

2.6 Obésité et cellules iNKT

Le TA humain est enrichi en cellules iNKT. Chez un individu sain, elles y représentent environ 15 à 20 % de la population totale des LT³⁸. Les cellules iNKT produisent une grande quantité de cytokines régulateurs/anti-inflammatoires, comme de l'IL-4 et de l'IL-10 qui contribuent à l'homéostasie du tissu adipeux⁶⁰. Ces cytokines ont la capacité d'inhiber la production et les effets des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-10 promeut également le switch phénotypique des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (M2)^{37,38}.

Chez un individu obèse, le nombre de cellules iNKT y sera fortement réduit. Effectivement, par rapport à des personnes lean, une diminution de plus de 50% du nombre de cellules iNKT est observée chez une personne obèse⁶¹. Il existe une corrélation positive entre l'obésité et la diminution du nombre de cellules iNKT. Par ailleurs, leur nombre est inversement corrélé au nombre de macrophages pro-inflammatoires dans le TA⁶⁰. En effet, dans un individu lean, les cellules iNKT résidentes dans le TA régulent les fonctions des macrophages et adipocytes. Alors que chez une personne obèse, les cellules iNKT y sont épuisées, elles n'exercent plus leur fonction régulatoire. Cela laissant place à un TA qui devient un environnement inflammatoire au vu de l'accumulation de macrophages pro-inflammatoires⁶².

Cette diminution du nombre de cellules iNKT est également observée dans le sang périphérique des patients obèses par rapport aux individus lean et en bonne santé^{35,37,38}. Toutefois, il s'avérerait que cette diminution puisse être réversible. En effet, il semblerait que, les individus ayant subi une chirurgie bariatrique récupèrent un nombre normal de cellule iNKT 6 mois après l'intervention^{38,63,64}.

3. Monocyte

3.1 Généralités

Les monocytes sont définis comme étant des cellules sanguines circulantes⁶⁵. Ce sont des cellules immunitaires innées de la lignée myéloïde⁶⁶ qui comptent pour environ 10 % de la population totale des leucocytes circulant chez l'Homme^{65,67}. Ces cellules exercent un rôle central dans la réponse immune, l'inflammation et l'homéostasie en éliminant les pathogènes et les cellules mortes, en initiant l'immunité adaptative⁶⁸. Les monocytes sont retrouvés dans la circulation sanguine, mais peuvent être recrutés dans des tissus pour se différencier, en fonction de l'environnement, en macrophage ou en cellule dendritique⁶⁹.

De façon très conceptuelle, les monocytes peuvent se différencier en macrophage et ces derniers peuvent se polariser avec un phénotype M1 ou M2. Le phénotype M1 correspond aux macrophages classiquement activés, ils sont caractérisés par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 et IL-18) et d'autres médiateurs (chimiokines, radicaux libres). Ils ont une fonction pro-inflammatoire, bactéricide et de phagocytose. Alors que le phénotype M2 est lié à un phénotype anti-inflammatoire, les macrophages sont appelés alternativement activés. Ils sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1RII, IL-1RA et TGF- β), des chimiokines (CCL-17, CC18, CCL-22 et CCL-24) et des facteurs de croissance (VEGF, EGF, PDGF)^{70,71}.

3.2 Sous populations

Les monocytes humains peuvent être divisés en 3 sous-populations distinctes en fonction de l'expression des marqueurs de surface suivant :

- CD14 : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires se liant au lipopolysaccharide et corécepteur pour des TLR.
- CD16 : code pour un récepteur de faible affinité de la partie Fc des immunoglobulines de type G, également appelé Fc γ RIII⁷²

Parmi ces 3 sous-populations, on retrouve les monocytes dits « classiques » (CM) exprimant hautement le CD14 et n'exprimant pas le CD16 (CD14⁺⁺, CD16⁻), ils représentent environ 80-90 % de monocytes sanguins. Les monocytes « intermédiaires » (IM) expriment eux à la fois le CD14 et le CD16 fortement (CD14⁺⁺, CD16⁺) et comptent pour environ 2 à 5 %. Alors que les monocytes « non classiques » (NCM) expriment faiblement le CD14 et fortement le CD16 (CD14⁺, CD16⁺) et comptent pour 2 à 10% (tableau 4)^{67,73}.

Sous-population	Expression marqueur de surface	Répartition
Monocytes classiques (CM)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	80-90%
Monocytes intermédiaires (IM)	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	2-5%
Monocytes non classiques (NCM)	CD14 ⁺ CD16 ⁺	2-10%

Tableau 4 : répartition des sous-populations monocytaires et leur phénotype.

3.3 Fonctions

Les monocytes jouent un rôle central dans l'immunité innée, en supportant l'homéostasie des tissus, en initiant et propageant la réponse immune contre des pathogènes et en résolvant l'infection avant d'avoir des dommages tissulaires excessifs⁷⁴. Ces cellules possèdent différentes fonctions telles que la phagocytose, la sécrétion de cytokines inflammatoires et la production d'espèces réactives de l'oxygène⁷⁵.

Les 3 sous-populations peuvent montrer des capacités fonctionnelles différentes. Les CM sont impliqués dans différentes fonctions comme la réparation tissulaire, ils vont aider à la cicatrisation des plaies et à la coagulation⁷⁴. Lors d'une infection, ce sont eux qui vont reconnaître les pathogènes, les phagocyter, sécréter de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et recruter d'autres types cellulaires pour réguler la réponse inflammatoire⁷⁶. Du côté des IM, ils sont considérés comme étant le type de monocyte responsable de la prolifération et de la stimulation des LT⁷⁷ car des taux élevés de marqueurs de surfaces impliqués dans la présentation d'antigènes y sont trouvés, tel que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. En plus de produire énormément d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), ils sont impliqués dans l'angiogenèse^{74,78}. Pour finir, les NCM sont responsables de la stimulation et prolifération des LT CD4+, ils vont stimuler la production d'IL-4 par les LT CD4+. Ils sont aussi considérés comme des monocytes qui « patrouillent » au niveau de l'endothélium, ils surveillent le côté luminal de l'endothélium vasculaire pour y maintiennent l'homéostasie. Des signes d'inflammation ou de dommage mobilisent les NCM au niveau de ce site par transmigration⁷⁴.

3.4 Obésité et monocytes

Chez l'homme, l'augmentation de son BMI est positivement associée à une augmentation du nombre de monocytes sanguins circulants⁷⁹. En plus d'une augmentation de leur nombre, il y a un déséquilibre penchant vers le phénotype M1 des monocytes qui est un phénotype pro-inflammatoire. C'est-à-dire que ces cellules produisent préférentiellement et de manière plus élevée des cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF- α et l'IL-6 et sécrètent de façon faible des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10⁸⁰. Des études ont décrit, dans des pathologies chroniques humaines associées à une inflammation de bas-grade, comme l'obésité, une diminution de la proportion de monocytes classiques et augmentation de la proportion des monocytes intermédiaires et non-classiques, deux catégories de monocytes dites « pro-

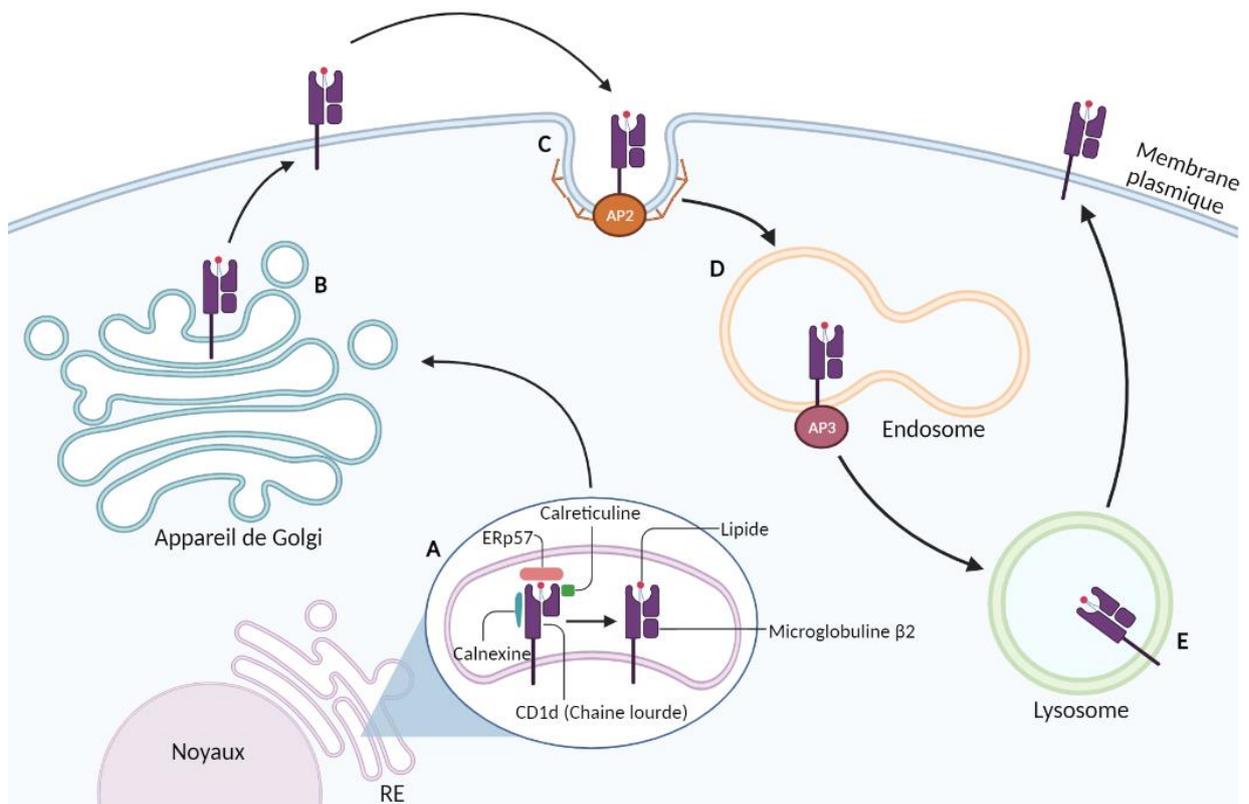


Figure 4 : adaptée à partie de « CD1 antigen presentation: How it works ». Cycle du CD1d.

- (A) La chaîne lourde du CD1d se lie une microglobuline $\beta 2$ avec l'aide de protéines chaperonnes au sein du RE. (B) Le CD1d transite ensuite par l'appareil de Golgi pour après atteindre la membrane plasmique. (C) Il est internalisé de manière dépendante de son motif tyrosine qui se lie à une AP2. (D) Le CD1d s'accumule dans des endosomes grâce à une AP3. (E) Il va ensuite dans des lysosomes pour être recyclé et charger d'un nouveau lipide.

inflammatoire »^{75,77}. Cette augmentation de la population de monocytes non-classiques est retrouvée également dans d'autres maladies que l'obésité, comme le diabète et la tuberculose. Ce type de monocytes pourrait contribuer à l'inflammation chronique retrouvée dans l'obésité⁸¹.

4. CD1d

Le CD1d est une molécule non-polymorphique, qui est apparentée au CMH de classe I. Elle a comme fonction de présenter des antigènes glycosphingolipidiques ou phospholipidiques aux cellules Natural Killer T (NKT). Chez les rongeurs, seul le CD1d est exprimé alors que chez l'humain, il existe en plus 4 autres molécules CD1 (CD1a, CD1b, CD1c et CD1e) qui présentent des lipides à des LT différents des cellules iNKT⁸². Le CD1d est exprimé constitutivement sur toutes les CPA au niveau des tissus périphériques et dans le sang, par exemple sur les LB, les macrophages, les cellules dendritiques⁸³.

4.1 Chargement des lipides sur le CD1d

Les molécules de CD1 sont assemblées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où leur chaîne lourde se lie à une microglobuline $\beta 2$ de manière non-covalente grâce aux protéines chaperonnes (calnexine, ERp57 et calréticuline)^{83,84}. Ensuite, le CD1d suit la route sécrétoire à travers l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique, qu'il atteint dans les 30 minutes après sa biosynthèse^{34,85}. Après il subit des « cycles » d'internalisation et de recyclage entre la membrane plasmique et le compartiment endosomal/lysosomal d'une manière dépendante d'un motif tyrosine encodé dans la queue cytoplasmique de la molécule. Le motif tyrosine se lie à des protéines adaptatrices (AP) qui causent l'internalisation et une accumulation du CD1d dans les lysosomes et les endosomes tardifs (figure 4)⁸⁶.

Après sa biosynthèse, le CD1d peut capturer un antigène lipidique exogène ou endogène et le présenter à la surface cellulaire⁸⁷.

Dans le cas des antigènes endogènes, ils sont synthétisés dans les CPA et chargés sur les CD1d dans le RE à l'aide d'une MTTP (microsomal triglyceride transfer protein) (figure 5). Concernant les antigènes exogènes, ils peuvent être capturés de 4 manières différentes avant d'être chargés sur le CD1d (figure 5) :

- Internalisés de façon clathrine dépendante où les antigènes lipidiques se lient à des apolipoprotéines E (apoE). Ce complexe ainsi formé se lie au récepteur des lipoprotéines de basses densités (LDLR)
- Phagocytés.

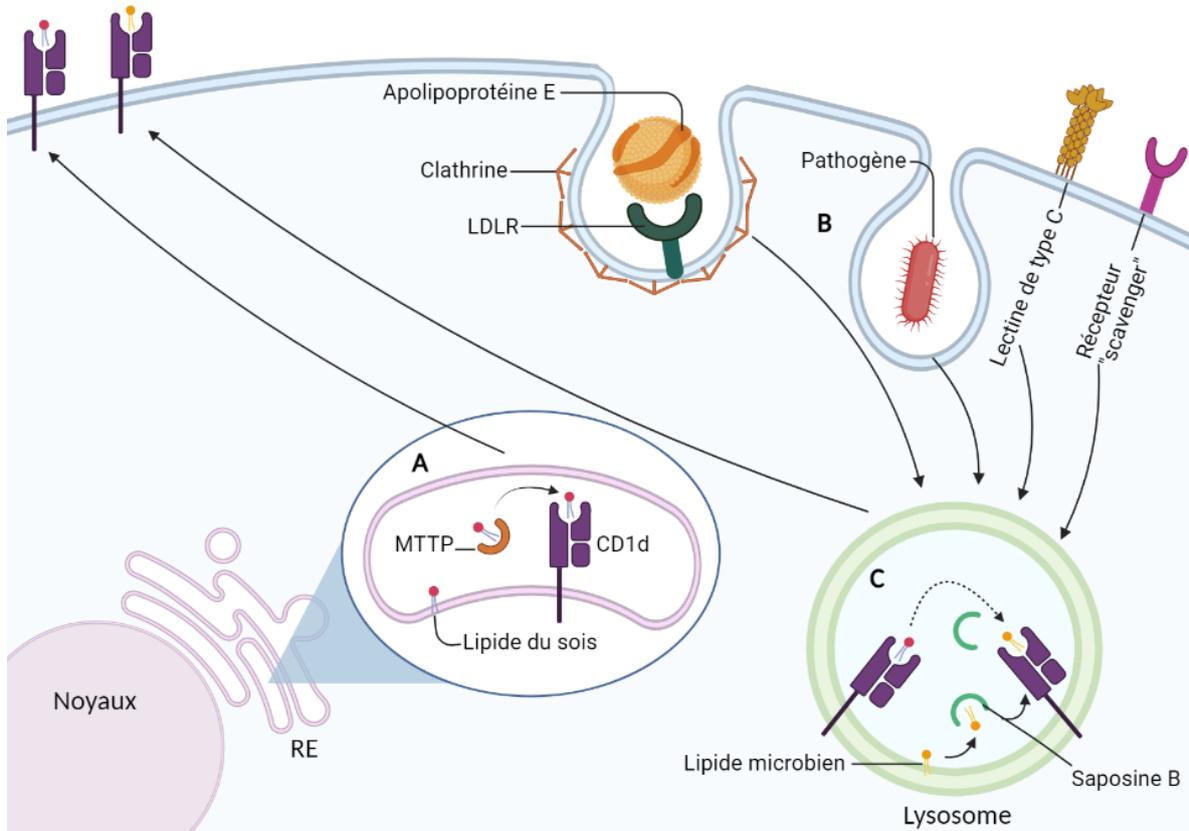


Figure 5 : adaptée à partir de « CD1 antigen presentation: How it works ». (A) Les antigènes lipidiques endogènes sont chargés au niveau de CD1d dans le RE avec l'aide d'une MTP. (B) Les antigènes lipidiques exogènes peuvent être capturés par phagocytose, grâce à une interaction entre des apoE et des LDLR, aux lectines de type C et aux récepteurs « scavenger ». (C) Ils sont chargés sur des CD1d au niveau de lysosomes grâce à des saposines B. (D) Les complexes CD1d-lipides sont acheminés à la membrane plasmique.

- Des lectines de type C se lient aux portions glucidiques des antigènes d'une manière dépendante du calcium.
- Internalisés grâce à des récepteurs scavengers^{85,88}.

Les antigènes lipidiques sont ensuite chargés sur des CD1d au sein d'endosomes tardifs ou lysosomes avec l'aide de protéine de transfert lipides tels que des saposines B. Pour qu'enfin, le complexe CD1d-antigène atteigne la membrane plasmique (figure 5)^{85,89}.

Hypothèse(s) de travail,
objectifs poursuivis et stratégie
utilisée pour atteindre ces
objectifs

L'obésité est devenue un problème de santé publique majeur en prenant des proportions épidémiques car plus de 13% de la population mondiale adulte en souffre¹. De plus, l'obésité favorise le développement du DT2, de maladies cardiovasculaires ainsi que de cancers⁶. Il est observé dans le cadre de l'obésité une inflammation systémique chronique de bas grade associée à une production anormale de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires. Cette inflammation joue un rôle clé dans le développement des comorbidités associées à l'obésité¹¹.

Par ailleurs, il a été reconnu que l'obésité affectait différentes populations de cellules immunitaires, pouvant mener à une perte d'immuno-surveillance. Cette perte d'immuno-surveillance jouerait un rôle dans l'augmentation de la susceptibilité des patients obèses à développer certaines infections et types de cancers¹².

Le nombre de cellules iNKT périphériques est diminué chez les patients obèses²⁹. Cependant, l'impact de l'obésité avec ou sans dysglycémie n'a pas encore été étudié sur le phénotype et l'activité de ces cellules T non-conventionnelles alors qu'elles jouent un rôle important dans l'immuno-surveillance. Des résultats antérieurs générés au sein du laboratoire ont notamment démontré une augmentation significative des niveaux de CD1d à la surface des monocytes ainsi qu'une modulation du phospholipidome des PBMCs de patients obèses présentant une intolérance au glucose par rapport à des patients sains et des patients obèses normo-glycémiques. Sur base de ces résultats préliminaires, le laboratoire a émis l'hypothèse qu'une présentation d'antigènes (glyco)lipidiques endogènes via le CD1d par des monocytes de patients obèses pourrait être à l'origine d'une activation chronique et/ou exacerbée des cellules iNKT, conduisant à leur épuisement et/ou apoptose, ce qui pourrait contribuer à la perte d'immunosurveillance observée chez ces patients.

L'objectif durant ce mémoire était d'étudier l'impact de l'obésité avec ou sans intolérance au glucose sur les cellules iNKT venant du sang. Pour cela, une cohorte de 3 catégories de patients (patients sains, patients obèses normo-glycémiques et patients intolérants au glucose) a été initiée.

Pour atteindre cet objectif, les cellules iNKT du sang périphérique des différentes catégories de patients ont été caractérisées en observant leur nombres, l'expression de différents marqueurs ainsi que leur activité. Un phénotypage des monocytes (sous-classes, CD1d) a été réalisés afin de valider la surexpression du CD1d au niveau des monocytes de patients obèses intolérants au glucose.

Matériel et méthodes

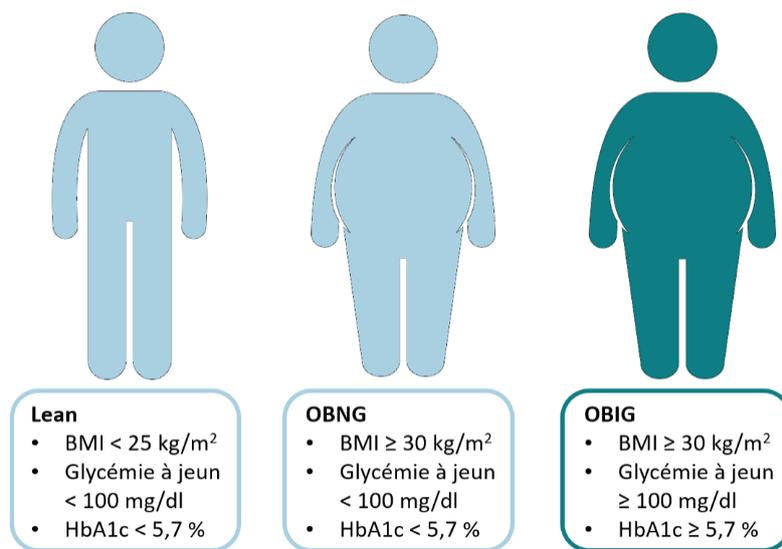


Figure 6 : Groupes de patients classés en fonction de leur BMI, glycémie à jeun et hémoglobine glyquée.

1. Matériel

1.1 Participants

Lors de ce mémoire une cohorte a été lancée, dans laquelle 20 patients par groupe, donc un total de 60 patients doivent être recrutés. Les patients sont subdivisés en 3 catégories distinctes en fonction de leur BMI, de leur glycémie à jeun et de leur hémoglobine glyquée (HbA1c). Les patients dits « lean » ont un BMI inférieur à 25 kg/m² au contraire des personnes qualifiées « d'obèses » qui sont caractérisées par un BMI supérieur ou égal à 30 kg/m². Les individus obèses normo-glycémiques ou lean possèdent une glycémie à jeun inférieure à 100 mg/dL et HbA1c à 5,7% (figure 6). En revanche, les patients obèses intolérants au glucose ont une glycémie à jeun supérieure ou égale à 100 mg/dL et une HbA1c supérieure ou égale à 5,7%. Les patients étant âgés de moins de 18 ans ou de plus de 65 ans, ayant une maladie inflammatoire chronique ou ayant des antécédents de cancers ont été exclus de l'étude. Lors de la rédaction de ce mémoire, 13 patients ont été recrutés. Dont 6 patients appartiennent à dans la catégorie des lean (5 femmes et 1 homme), 5 patients étaient dans les obèses normo-glycémiques (OBNG, 5 femmes et 0 homme) et 1 patient se trouvait dans les obèses intolérants au glucose (OBIG, 1 femme et 0 homme).

Chaque patient a réalisé une visite médicale comprenant une collecte de données anthropomorphiques (la mesure de son tour de taille, de sa taille, de son poids et de sa tension artérielle) et médicamenteuses. Par ailleurs, un bilan sanguin complet a été réalisé afin de collecter les informations reprises dans le tableau 5.

Cette étude clinique a été approuvée par le comité d'éthique hospitalo-facultaire universitaire de Liège (numéro d'acceptation : 2020/374) et chaque patient a également donné son consentement écrit pour participer à l'étude.

1.2 Solutions

Cette partie regroupe diverses solutions qui ont été employées lors des expériences de ce mémoire :

- FACS buffer : Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Biowest, Louvain, Belgique) avec 3% de FBS (Fetal Bovine Serum F7524, Sigma-Aldrich, Overijse, Belgique)
- Milieu de culture complet : milieu RPMI 1640 contenant de la glutamine (Biowest) supplémenté avec 10% de FBS (Sigma-Aldrich), du 2-mercaptoethanol 50 µM

Paramètres sanguins	Valeurs de références
Glycémie à jeun	60-100 mg/dl
Hémoglobine glyquée	4-6%
Insuline à jeun	<104 pmol/L
Triglycérides	<175 mg/dl
Cholestérol total	<190 mg/dl
Cholestérol LDL	<115 mg/dl
Cholestérol HDL	>45 mg/dl
Cholestérol Non-HDL	<145 mg/dl
Érythrocytes	3,9 – 4,9 10 ⁶ /mm ³
Hémoglobine	11,7 – 15 g/dl
Plaquettes	150 - 350 10 ³ /mm ³
Leucocytes	4,6 - 10,1 10 ³ /mm ³
Neutrophiles	2,2 - 6,1 10 ³ /mm ³
Lymphocytes	1,1-3,7 10 ³ /mm ³
Monocytes	0,3 – 1,1 10 ³ /mm ³
Éosinophiles	0 – 0,5 10 ³ /mm ³
Basophiles	0 – 0,1 10 ³ /mm ³
Urée	15-40 mg/dl
Créatinine	0,55-1,02 mg/dl
Protéines totale	58-83 g/l
Albumine	35-52 g/l
CRP	0,0 - 5,0 mg/dl
Bilirubine totale	0,3-1,2 mg/l
Bilirubine conjuguée	<0,5 mg/l
Vitamine D	20 – 50 ng/ml

Tableau 5 : Paramètres sanguins principaux et leur valeur de références associées.

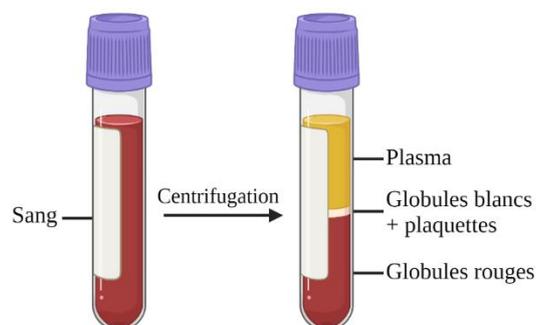


Figure 7 : centrifugation de sang dans des tubes contenant de l'EDTA.

(Gibco™, ThermoFisher Scientific, USA) et de la Streptomycine-pénicilline 100 U/mL (Gibco™, ThermoFisher Scientific)

- Milieu de stimulation : milieu RPMI 1640 contenant de la glutamine (Biowest) supplémenté avec 10% de FBS (Sigma-Aldrich), du 2-mercaptoethanol 50 µM (Gibco™), de la Streptomycine-pénicilline 100 U/mL (Gibco™), de l'α-Galactosylcéramide 200 ng/ml (KRN7000, Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) et de l'IL-2 100 ng/ml (Recombinant Human IL-2, Perprotech, Londres, Royaume-Unis)
- Solution concentrée d'α-Galactosylcéramide : 10 µl de la solution stock d'α-Galactosylcéramide (Avanti Polar Lipids) est décongelé et vortexer durant 1 minute. Ensuite, cette solution est chauffée à 80°C pendant 2 minutes. Avant d'être, vortexée durant 1 minute. Les 10 µl de stock sont ensuite dilués dans 5 ml de milieu RPMI 1640 supplémenté en glutamine (Biowest) afin d'obtenir une concentration intermédiaire de 2000 ng/ml (10X). La solution est de nouveau chauffée à 80°C durant 2 minutes et vortexer 1 minute. Elle est ensuite conservée à 4°C durant maximum deux semaines.
- Solution de congélation concentrée : FBS (Sigma-Aldrich) avec 20% de Dimethyl sulphoxide (DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne).

2. Méthodes

Cette étude clinique est décomposée en 2 cohortes distinctes, la première a été lancée durant ce mémoire et a, pour but, de caractériser l'impact de l'obésité et/ou de l'intolérance au glucose sur les cellules iNKT périphériques. La seconde cohorte a comme objectif de caractériser l'impact de l'obésité et/ou de l'intolérance au glucose sur l'interaction entre les cellules iNKT et les monocytes. Les expériences de la seconde cohorte sont encore au stade de la mise au point.

2.1 Collection des données, du sang et du plasma

Au J0, une collecte de données anthropomorphiques et médicamenteuses, ainsi qu'un bilan sanguin sont effectués. En plus du sang pour le bilan sanguin, 60 ml de sang supplémentaire sont récoltés dans des tubes contenant de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Ce sang subit, dans un premier temps, une centrifugation de 20 minutes à 4°C à 1200 rpm (Revolutions Per Minute). Après celle-ci, deux phases sont observées, l'une étant le plasma et l'autre le reste du sang (figure 7). Le plasma est récolté et est placé dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml qui sont ensuite conservés à -80°C pour de futures analyses. Alors que le reste du sang est utilisé pour isoler les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells).

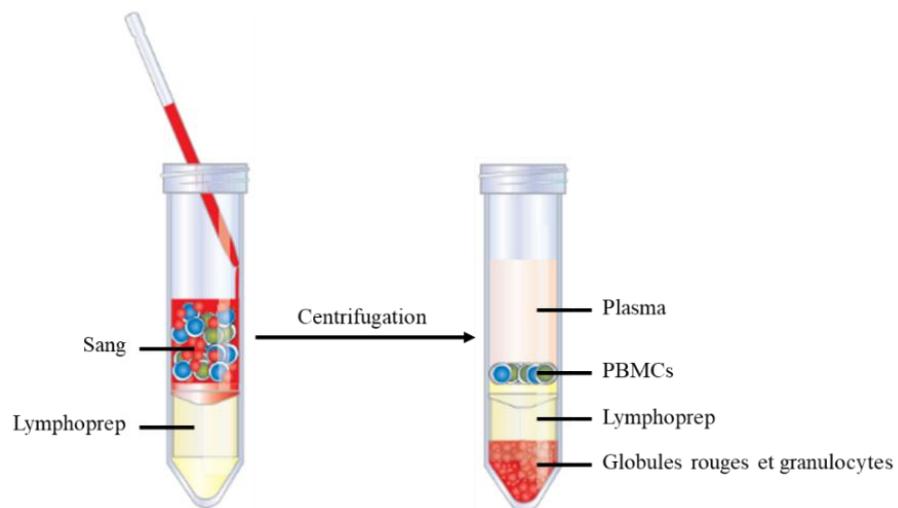


Figure 8 (adaptée à partir de <https://www.stemcell.com/products/brands/sepmate-pbmc-isolation.html>) : isolation de PBMCs. Du sang est déposé sur du Lymphoprep, après centrifugation, une séparation des différents constituants du sang est observés : plasma, PBMCs, globules rouges et granulocytes.

2.2 Extraction des PBMCs

Après avoir récolté le plasma, le reste du sang est dilué dans du PBS afin d'obtenir un volume de 50 ml. L'isolation des PBMCs se réalise à l'aide d'un milieu à gradient de densité, le Lymphoprep® (Stemcell™, Cologne, Allemagne), permettant l'isolation des PBMCs en exploitant les différentes densités cellulaires. En effet, les globules rouges (GR) et les granulocytes ont une plus grande densité que les cellules mononuclées. Approximativement 17 ml de sang dilué est disposé sur 15 ml de Lymphoprep® contenu dans des tubes SepMate™ (Stemcell™, Cologne, Allemagne). Les tubes SepMate sont des tubes qui permettent une isolation rapide et facile des PBMCs en 15 minutes. En effet, ces tubes ont un insert permettant de déposer rapidement le sang dilué sur le milieu à gradient de densité en évitant de mélanger le sang et le Lymphoprep®. Après une centrifugation de 10 min à 2500 rpm (1200g) à température ambiante, les différents constituants du sang sont ainsi séparés en plusieurs couches. La couche inférieure est composée des globules rouges et des granulocytes qui ont une plus grande densité que le Lymphoprep. Au-dessous des GR et granulocytes, on retrouve les PBMCs puis la dernière couche composée du plasma (figure 8). Cette couche supérieure est retirée avant de récolter les PBMCs.

Les PBMCs sont alors récupérés avant d'être lavés deux fois à l'aide de PBS. Le nombre de PBMCs est ensuite compté grâce à au compteur de cellule automatique TC10™ (Bio-Rad, Tamise, Belgique). Les PBMCs sont ainsi répartis dans différents tubes, dans lesquels leur nombre varie en fonction de l'expérience. En effet, 1×10^6 de PBMCs sont placés dans chaque tubes FACS pour le panel I et II des cellules iNKT et $0,5 \times 10^6$ dans le cas du panel des monocytes. Alors que pour la production de cytokines et la prolifération, 1×10^6 par condition sont suspendus de nouveau dans un milieu de culture adéquat. Tout ceci, sera expliqué plus précisément dans la suite.

2.3 Congélation des PBMCs

Le reste de cellules non utilisées pour les expériences décrites ci-dessus sont congelées dans la solution de congélation. Après une centrifugation à 1200 rpm durant cinq minutes à RT, le surnageant est enlevé et le culot de cellules est suspendu de nouveau dans du FBS à une densité de 2 millions de cellules par 900 µl de FBS. 900 µl de suspension cellulaire est transféré dans un cryotube (Greiner Bio-One, Vilvoorde, Belgique). Ensuite, 900 µl de solution de congélation sont ajoutés au goutte à goutte aux PBMCs. Tous les tubes sont placés dans des contenants appelés Mr. Frosty™ (Nalgene, ThermoFisher Scientific™) ou CoolCell™

(Corning®, Lasne, Belgium) et placés dans un congélateur à -80°C pendant au moins 24h. Ces contenants permettent de congeler les cellules en diminuant la température des tubes d'un degré par minute. Après au moins 24h, les tubes sont transférés dans une boîte de stockage avant d'être transférés à la BHUL.

2.4 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet de réaliser différentes mesures sur des cellules ou particules en suspension dans un liquide. Cette technologie peut simultanément analyser et mesurer de nombreuses caractéristiques comme la taille, la granulosité, le contenu cellulaire, l'intensité de fluorescence de cellule passant à travers un faisceau de lumière. Ces analyses peuvent être effectuées sur différentes particules d'intérêts comme des cellules, des chromosomes, des bactéries.

Le cytomètre en flux est constituée de 3 parties : un système fluidique, un système optique et un système électronique. Le principe de la cytométrie en flux est qu'une suspension cellulaire que l'on souhaite analyser est injectée sous haute pression dans le système fluidique. Grâce au principe nommé centrage hydrodynamique, les cellules vont s'aligner et se placer les unes derrière les autres dans ce faisceau. Elles vont ensuite traverser le système optique que se compose de lasers, de photomultiplicateurs et de filtres afin d'exciter, détecter et amplifier les signaux émis par les fluorochromes présents à la surface ou à l'intérieur des cellules. Ces fluorochromes vont émettre de la fluorescence détectée par le système électronique. Ce système détecte également la lumière diffusée par les cellules.

Cette lumière diffusée va permettre de donner des informations sur la morphologie et la granulosité des cellules. La lumière mesurée dans l'axe du laser renseigne sur la taille des cellules (nommé FSC, Forward-Scattered light), alors que la lumière mesurée à 90° donne des données correspondant à la complexité intracellulaire de la cellule (nommé SSC, Side-Scattered light).

Toutes les analyses de cytométrie en flux qui ont eu lieu durant ce mémoire ont été réalisées à l'aide du cytomètre en flux FACS Verse (BD Biosciences, San Jose, USA). Ce cytomètre permet de mesurer deux paramètres physiques (FSC et SSC) grâce à la diffusion d'une lumière blanche. Il possède également 3 lasers qui permettent de mesurer jusqu'à 8 paramètres de fluorescence. De plus, il est possible de quantifier le nombre de cellules passant dans le cytomètre par microlitre afin de connaître le nombre réel de cellule contenue dans l'échantillon.

Panel I – iNKT		
Anticorps (Fluorochrome)	Volume	Clone (Firme)
CD3 (BV510)	3 µl	Clone UCHT1 (BioLegend)
Vα24Jα18 (APC)	5 µl	Clone 6B11 (BioLegend)
CD25 (PE/Cy7)	5 µl	Clone BC96 (BioLegend)
CD69 (FITC)	5 µl	Clone FN50 (BioLegend)
CD95 (PE)	3 µl	Clone DX2 (BioLegend)
PD-1 (BV421)	3 µl	Clone EH12.2H7 (BioLegend)

Tableau 6 : anticorps du panel I des cellules iNKT associés à leur fluorochrome correspondant, le volume optimal et ainsi que leur clone.

Panel II – iNKT		
Anticorps (Fluorochrome)	Volume	Clone (Firme)
CD3 (BV510)	3 µl	Clone UCHT1 (BioLegend)
Vα24Jα18 (APC)	5 µl	Clone 6B11 (BioLegend)
CD4 (BV421)	3 µl	Clone A161A1 (BioLegend)
CD8 (PerCp)	3 µl	Clone SK1 (BioLegend)
CD56 (PE)	10 µl	Clone B159 (BD Biosciences, San Jose, USA)
CD161 (PE/Cy7)	3 µl	Clone HP-3G10 (BioLegend)
NKG2D (FITC)	3 µl	Clone 1D11 (BioLegend)

Tableau 7 : anticorps du panel II des cellules iNKT associés à leur fluorochrome correspondant, le volume optimal et ainsi que leur clone.

Panel monocytes		
Anticorps (Fluorochrome)	Volume	Clone (Firme)
CD3 (PE)	2 µl	Clone HIT3a (BioLegend)
CD19 (PE)	2 µl	Clone 4G7 (BioLegend)
CD56 (PE)	10 µl	Clone B159 (BD Biosciences)
HLA-DR (BV510)	1,5 µl	Clone L243 (BioLegend)
CD14 (eFluor 450)	1,5 µl	Clone 61D3 (eBioscience, ThermoFisher)
CD16 (APC-eFluor 780)	2 µl	Clone eBioCB16 (eBioscience, ThermoFisher)
CD1d (APC)	1,5 µl	Clone 51.1 (BioLegend)

Tableau 8 : anticorps du panel des monocytes associés à leur fluorochrome correspondant, le volume optimal et ainsi que leur clone.

2.4.1 Panels extracellulaires

Dans chaque tube FACS, de $0,5 \times 10^6$ à 1×10^6 de PBMCs y sont placés. Ils y sont lavés dans 1 ml de PBS et centrifugés à 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé et les tubes sont vortexés afin de re-suspendre le culot cellulaire. Ensuite, 100 µl de marqueur de viabilité (zombie NIR™ pour les panels sur les cellules iNKT (Fixable Viability Kit, BioLegend, Amsterdam, Pays-bas) ou zombie GREEN™ pour le panel des monocytes (Fixable Viability Kit, BioLegend)) sont ajoutés aux cellules et incubés pendant 20 minutes dans le noir à température ambiante. Ces marqueurs de viabilité sont des colorants fluorescents réactifs aux amines, ils ne sont pas perméables aux cellules vivantes mais aux cellules mortes dont leur membrane est fragilisée. Ainsi, lors de l'analyse au FACS les populations de cellules vivantes des cellules mortes peuvent être discriminé. Après incubation, les cellules sont lavées dans 2 ml de FACS buffer et centrifugées à 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le FACS buffer va permettre de laver et d'inactiver le zombie NIR qui n'est pas entré dans les cellules. Après centrifugation, le surnageant est enlevé et le culot de cellules est suspendu en vortexant rapidement le tube. Les différents anticorps du panel sont mis en contact avec les cellules durant 20 minutes dans le noir à 4°C. En fonction du panel, des anticorps différents sont utilisés, ceux-ci sont listés dans le tableau 6, le tableau 7 et le tableau 8. A noter que pour le panel de prolifération seul les anticorps CD3 et TCR sont utilisés. Ensuite, les PBMCs sont une dernière fois lavés dans 1 ml de PBS, centrifugés à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé et les tubes sont vortexé afin de re-suspendre le culot cellulaire. Les cellules sont suspendues de nouveau dans 300 µl pour les analyser dans le FACS Verse.

2.4.2 Panel intracellulaire

Les PBMCs isolés de patients sont mis durant une nuit en culture. Le lendemain matin, seules les conditions stimulées sont mises en contact avec une solution stimulant la production de cytokine. Ensuite, une solution qui va retenir les cytokines dans les cellules iNKT est mise dans chaque puits (étapes expliquées en détails au point 2.5.1 production de cytokines). Pour chaque conditions différentes, 1×10^6 de PBMCs sont placés dans un tube FACS. Les cellules vont dans un premier temps être marqué avec les anticorps CD3 et Vα24Ja18 selon le protocole décrit au point 2.4.1, pour permettre le gating des cellules iNKT. Cependant, lors de la dernière étape, les cellules ne seront pas lavées dans 1 ml de PBS mais dans 1 ml de FACS buffer puis centrifugées à 500g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé et les tubes sont vortexés afin de re-suspendre le culot cellulaire. Ensuite, afin de réaliser un marquage intracellulaire, les cellules sont alors fixées dans 200 µl d'une solution de fixation (Fixation Buffer, BioLegend)

Anticorps (Fluorochrome)	Volume	Firme
IL-4 (PE)	4 μ l	Clone MP4-25D2, BioLegend
IFN- γ (FITC)	4 μ l	Clone 4S.B3, BioLegend

Tableau 9 : anticorps des marqueurs intracellulaires associés à leur fluorochrome correspondant, le volume optimal et ainsi que leur clone.

durant 20 minutes dans le noir à température ambiante. Les PBMCs sont lavés dans une solution de perméabilisation (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer, BioLegend), centrifugées à 4000 rpm durant 4 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé et les tubes sont vortexés afin de re-suspendre le culot cellulaire. Ensuite, les PBMCs sont incubés pendant 30 minutes dans le noir à température ambiante dans les anticorps marquant les cytokines retenues dans le cytoplasme des PBMCs (tableau 9). Les PBMCs sont lavés dans 1 ml de solution de perméabilisation, centrifugée à 4000 rpm durant 4 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé et les tubes sont vortexés afin de re-suspendre le culot cellulaire. Les cellules sont uspendues dans 300 µl pour les analyser dans le FACS Verse.

2.4.3 Compensation et titration des anticorps

Lors de la création d'un panel d'anticorps, où plusieurs fluorochromes sont présents, il est possible que le spectre d'émission de certains anticorps se chevauche. Pour régler ce problème, il est nécessaire de compenser les différents signaux. C'est-à-dire de supprimer mathématiquement la superposition des signaux de fluorescence des fluorochromes présents dans ce panel. Pour ce faire, une goutte calibrée de bille (UltraComp eBeads, eBiosciences, ThermoFisher) est conjuguée avec 1 µl d'anticorps dans un tube FACS et est incubée dans le noir durant 10 minutes à 4°C. Chaque anticorps doit être utilisé indépendamment des autres mais dans le cas où certains anticorps sont couplés au même fluorochrome, ceux-ci peuvent être mis en contact des mêmes billes. Les billes sont ensuite suspendues dans 200 µl de PBS avant d'être passées au FACS Verse pour réaliser les compensations, générées automatiquement par l'appareil. En plus des billes de compensation, des cellules marquées avec tous les anticorps du panel et un marqueur de viabilité sont passées au FACS. Afin de vérifier si les voltages utilisés sont adaptés aux populations cellulaires d'intérêts et si les compensations ont bien été effectuées. Pour réaliser ces mises au point, des PBMCs de donneurs sains (c'est-à-dire de patients non inclus dans la cohorte) ont été utilisés.

Chaque anticorps est ensuite titré afin de déterminer la concentration optimale à laquelle utiliser l'anticorps pour maximiser le signal sans pour autant créer du bruit de fond. Des PBMCs sont mis dans des tubes FACS où chaque tube est destiné à un anticorps à une concentration définie. Les différents tubes suivent le protocole détaillé au point 2.4.1, mais dans les tubes de titration aucun marqueur de viabilité n'y est placé.

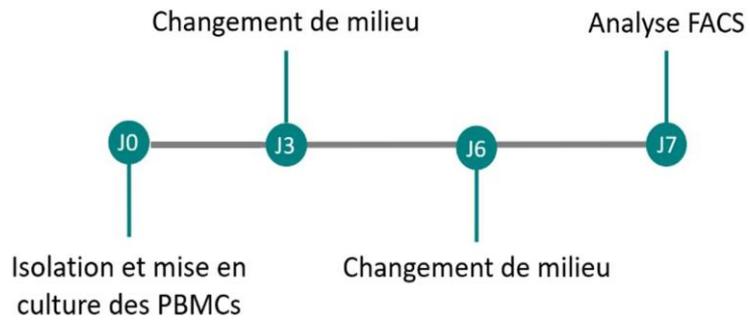


Figure 9 : ligne du temps de la prolifération.

2.5 Cohorte

2.5.1 Caractérisation des cellules iNKT et des monocytes

Comptage des cellules iNKT et analyses marqueurs membranaires des cellules iNKT et des monocytes

Pour procéder au comptage et à l'analyse des différents marqueurs membranaires présents à la surface des cellules iNKT, les PBMCs isolés de patient suivent le protocole détaillé au point 2.4.1 pour le panel I et II des cellules iNKT. De même que pour l'analyse des marqueurs membranaires retrouvés au niveau des monocytes (panel des monocytes).

Prolifération

Lors du J0, 1×10^6 de PBMCs sont mis en culture dans 600 μ l de milieu de stimulation (condition stimulée). 1×10^6 de PBMCs sont également mis en culture dans du milieu de culture complet (contrôle négatif de prolifération). Le milieu de stimulation va stimuler les cellules iNKT et induire leur prolifération. Le milieu est changé tous les 3 jours avec du milieu de stimulation déplété en α -GalCer, pour la condition stimulée, ou avec du milieu complet, pour la condition non stimulée. Après 7 jours de culture (figure 9), les cellules sont placées dans des tubes FACS où elles vont être marquées suivant le protocole détaillé au point 4.2.1. Afin d'analyser, la potentiel prolifération des cellules iNKT, un ratio de leur nombre au J7 sur leur nombre au J0 (J7/J0) a été effectué. Ce ratio permet de normaliser les éventuels biais de nombre existant entre les patients.

Production de cytokines

Les cellules iNKT sont stimulées afin d'observer leurs capacités à produire des cytokines en réponse à une stimulation. Une condition non stimulée est aussi réalisée afin d'observer la production de cytokines par les cellules iNKT sans qu'elles aient subit une stimulation. Pour cela, 1×10^6 de PBMCs par condition isolés sont mis en culture durant la nuit dans 600 μ l de milieu complet. Il y a deux conditions différentes, d'une part les PBMCs stimulés à la PMA-ionomycine et d'une autre part les PBMCs non stimulés.

Le jour de stimulation, 1,2 μ l d'un cocktail d'activation cellulaire (Cell Activation Cocktail without Brefeldin A, BioLegend) est ajouté à chaque condition stimulée. Ce cocktail d'activation est composé d'un mélange de phorbol 12-myristate-13-acetate 81 nM (1X) (PMA) et d'ionomycine 1,34 μ M (1X). Après une heure, d'incubation, 6 μ l d'une solution de rétention de cytokine sont ajoutés à chaque condition (stimulées et non-stimulées). Cette solution de rétention de cytokine est composée de Brefeldin A 3 mg/L (1X) (BioLegend) et de Monensin

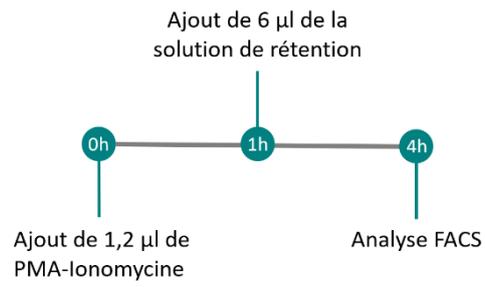


Figure 10 : ligne de temps de la stimulation des PBMCs avec de la PMA-ionomycine.

2 μ M (1X) (BioLegend). Les cellules sont ensuite incubées pendant 3 heures à 37°C. Les cellules sont donc incubées durant un total de 4 heures à 37°C. Après ces 4 heures d'incubation, les cellules sont placées dans des tubes FACS où elles suivent le protocole détaillé au point 2.4.2 (figure 10).

2.6 Analyses graphiques et statistiques

Les résultats obtenus grâce au cytomètre FACS Verse sont analysés sur le programme FlowJo V.10.4 (BD Biosciences). Les données obtenues sont ensuite importées sur le programme GraphPad Prism (Version 8.00 ; GraphPad Software, Tulsa, USA) afin de réaliser des graphiques où les données y sont exprimées en moyenne \pm écart-type (SD, Standard Deviation). Concernant les analyses statistiques choisies pour comparer les groupes de patients, nous avons choisi un t-test de student ou un Mann-Whitney en fonction, respectivement, du respect ou non de la normalité et de l'homogénéité des variances. Ces deux tests ont été choisis du fait du nombre trop faible de patients dans la catégorie des OBIG. En effet, un seul patient n'a été recruté actuellement, rendant la réalisation de statistique sur ce groupe impossible. Donc, seuls les groupes « Lean » et « OBNG » ont été analysés. Une p-value a été calculée pour chaque test statistiques et elle a été considérée comme statistiquement significative si $p < 0,05$.

Résultats

Anticorps	Dilutions testées
CD3	1 μ l ; 2 μ l ; 3 μ ; 4 μ l ; 5 μ l
V α 24J α 18	1 μ l ; 2 μ l ; 3 μ ; 4 μ l ; 5 μ l
CD4	1 μ l ; 2 μ l ; 3 μ ; 4 μ l ; 5 μ l
CD8	1 μ l ; 2 μ l ; 3 μ ; 4 μ l ; 5 μ l
CD56	2 μ l ; 2,5 μ l ; 5 μ l ; 10 μ l ; 15 μ l
NKG2D	1 μ l ; 2 μ l ; 3 μ ; 4 μ l ; 5 μ l
CD161	1 μ l ; 2 μ l ; 3 μ ; 4 μ l ; 5 μ l

Tableau 10 : Dilutions testées pour chaque anticorps du panel II des cellules iNKT.

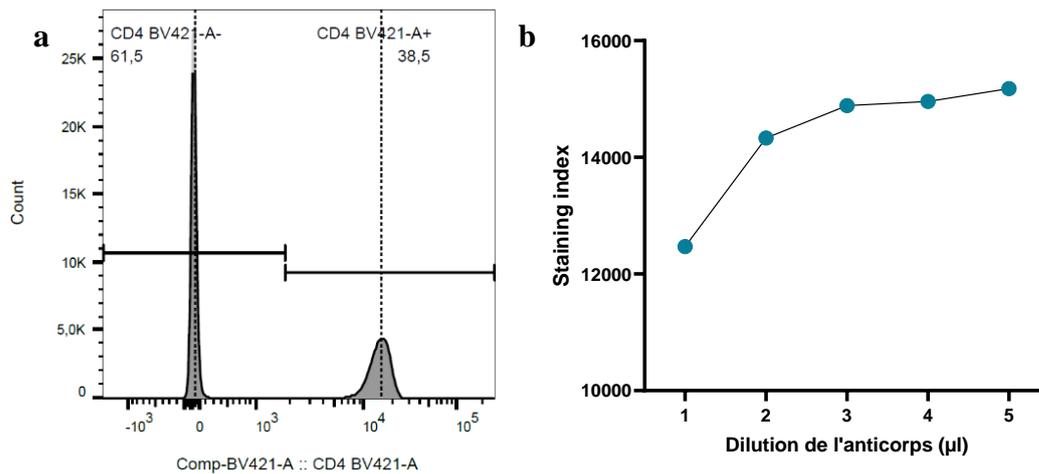


Figure 11 : Titration de l'anticorps ciblant CD4. (a) Histogramme représentant une population cellulaire négative au CD4 à gauche et à droite une population positive. (b) Graphique rapportant chaque SI de chaque dilution d'anticorps.

1. Mises au point des expériences de cytométrie en flux

1.1 Nouveau panel d'anticorps pour marqueurs membranaires de cellules iNKT (panel II)

Lors de la mise au point de panel d'anticorps en cytométrie en flux, 3 étapes essentielles sont à effectuer : les compensations, la titration et les FMO (florescence minus one) contrôles de chaque anticorps.

1.1.1 Compensation

Chaque anticorps repris dans le tableau 7 ont été compensés par l'ordinateur. Ensuite, des tubes FACS contenant tous les anticorps du panel ont été analysés par cytométrie en flux afin de déterminer si les compensations ont bien été effectuées. Ainsi, une première stratégie de gating est effectuée.

1.1.2 Titration

Après avoir réalisé les compensations, une titration a été effectuée pour chaque anticorps du panel II des cellules iNKT. En fonction des recommandations contenues dans la fiche technique de l'anticorps, 5 dilutions différentes ont été testées (voir tableau 10).

Afin d'analyser l'anticorps titré, pour chaque dilution de l'anticorps une fenêtre est placée afin de discriminer des populations positives et négatives comme on peut l'observer sur la figure 11a. En effet, le pic à gauche correspond à la population négative, ce sont des populations qui n'expriment pas le marqueur cellulaire et qui n'ont donc pas été marquées par l'anticorps. Au contraire, la population positive (à droite) exprime le marqueur cellulaire. Pour chaque dilution, le « Staining Index » (SI) est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{(MFI_1 - MFI_2)}{2 \times SD}$$

La MFI_1 correspond à la médiane de fluorescence de la population positive, la MFI_2 à la médiane de fluorescence de la population négative et la SD correspond à l'écart-type de la population négative.

Ensuite, sur un graphique, chaque SI de chaque dilution y est reportée. Grâce à ce graphique, la dilution adéquate de l'anticorps peut être déterminée. Elle correspond à la dilution permettant la meilleure discrimination des deux populations (figure 11b).

Anticorps	Concentrations choisies
CD3	3 μ l
TCR	5 μ l
CD4	3 μ l
CD8	3 μ l
CD56	10 μ l
NKG2D	3 μ l
CD161	3 μ l

Tableau 11 : concentrations choisies pour chaque anticorps du panel II des cellules iNKT.

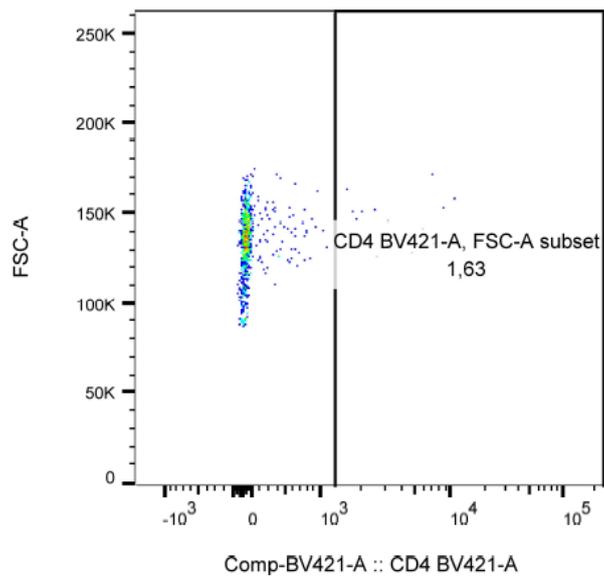


Figure 12 : FMO de l'anticorps CD4.

Dans le cas du CD4, la dilution de 3 μ l par million de PBMCs a été choisie. Car après 3 μ l, un plateau commence à apparaître (figure 11b) ce qui signifie que les dilutions supérieures n'améliorent pas la discrimination des populations.

Ainsi, les dilutions reprises dans le tableau 11 ont été choisies pour tous les anticorps.

1.1.3 FMO

Les FMO (Fluorescence Minus One) est la dernière étape avant de terminer la création d'un panel. Elle permet de déterminer l'emplacement des fenêtres de manière très précise, ce qui permettra d'appliquer la même stratégie de gating à chaque patient de la cohorte. Par exemple, pour la FMO de CD4, les PBMCs ont été marqués avec tous les anticorps du panel sauf CD4. Ainsi, sur la figure 12 on peut observer le résultat de la FMO du CD4.

Du fait que l'anticorps d'intérêt n'a pas été mis en contact avec les PBMCs, seule une population négative pour le marqueur est observée. Cette population sert de guide pour positionner les fenêtres de la stratégie de gating définitive. En effet, toute population se trouvant à droite de la population négative peut être considérée comme une population positive au marqueur.

1.1.4 Stratégie de gating

Grâce aux FMO effectuées sur chaque anticorps du panel, la stratégie de gating suivante a été obtenue. Tout d'abord, au sein de tous les PBMCs, les lymphocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille et leur granulosité données, respectivement, par la FSC et la SSC (figure 13a). Ensuite, tous les doublets présents (figure 13b) dans la fenêtre lymphocyte ont été supprimés en plaçant une fenêtre uniquement au niveau des singulet sur base de l'aire et de la hauteur. Les doublets sont distingués des singulets car les valeurs de leurs aires et hauteurs seront doublées par rapport à une cellule seule. De plus, seuls les lymphocytes vivants (figure 13c) sont sélectionnés grâce au marqueur de viabilité. Par après, les cellules iNKT ont été sélectionnées en prenant les cellules positives au CD3 et au V α 24Ja18 (chaîne α unique du TCR des cellules iNKT humaines) (figure 13d). Une fois les cellules iNKT sélectionnées, les différents marqueurs extracellulaires peuvent être analysés sur ces cellules iNKT. Les médianes de fluorescence du CD56, du CD161 et de NKG2D ont été analysées afin d'évaluer leur expression par les cellules iNKT (figure 13e-g). Pour finir, les différentes sous populations des cellules iNKT (CD4+, CD8+ et DN) sont analysées grâce aux marqueurs CD4 et CD8 (figure 13h).

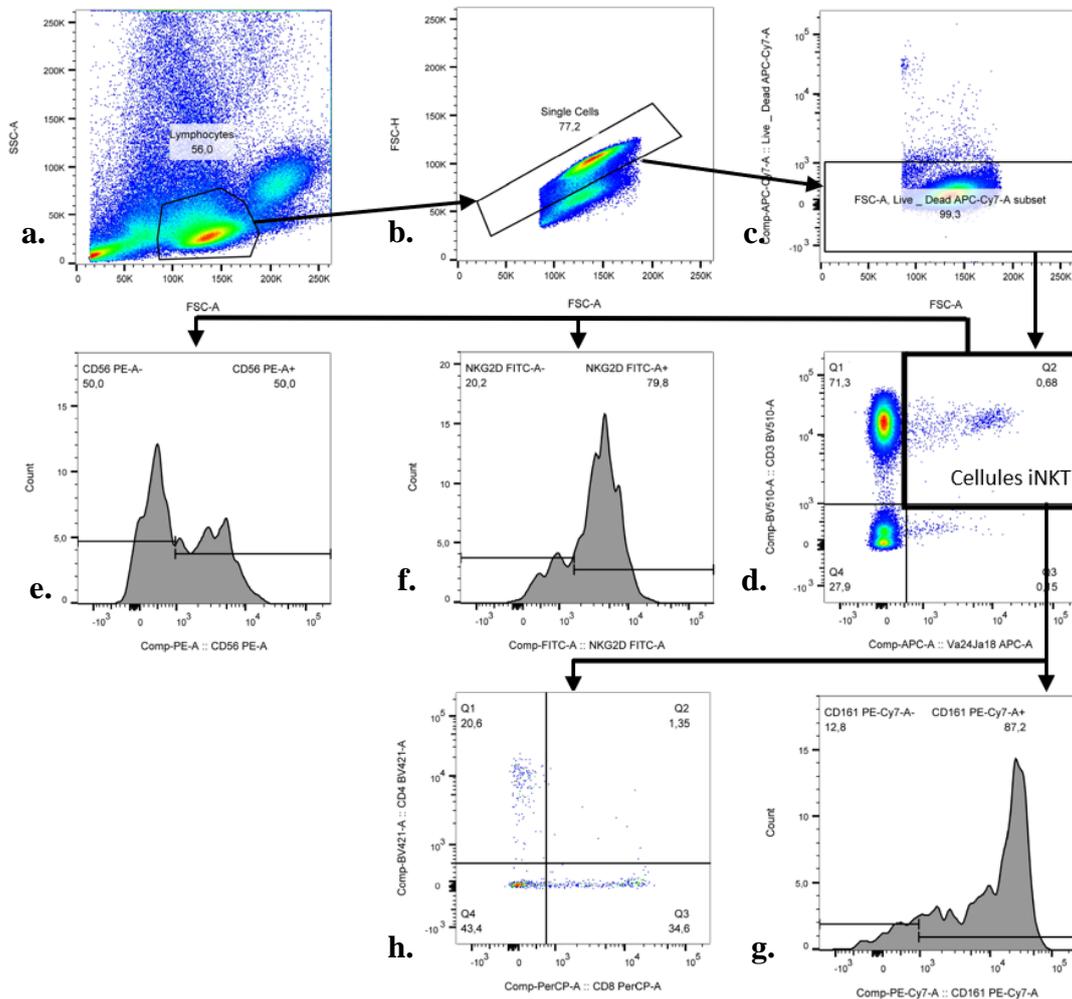


Figure 13 : Stratégie de gating du panel II des cellules iNKT utilisé afin de discriminer les cellules iNKT ainsi que les différents marqueurs exprimés par celles-ci. (a) Sélection des lymphocytes dans les PBMCs. (b) Élimination des doublets de cellules. (c) Élimination des cellules mortes. (d) Sélection des cellules CD3+ Va24Ja18 +. (e, f, g) Analyse de l'expression de marqueurs cellulaires. (h) Analyse des sous-populations de cellules iNKT (CD4+, CD8+ et DN).

Anticorps	Dilutions testées
CD3	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl
CD19	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl
CD56	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl
HLA-DR	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl
CD14	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl
CD16	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl
CD1d	1 µl ; 1,5 µl ; 2 µl ; 2,5 µl ; 3 µl

Tableau 12 : Dilutions testées pour chaque anticorps du panel des monocytes.

1.2 Panel des monocytes

1.2.1 Compensation

Chaque anticorps repris dans le tableau 8 a été compensé par l'ordinateur. Ensuite, en suivant le même principe que pour le panel précédent, une première stratégie de gating a pu être créée.

1.2.2 Titration

Après, une titration a été effectuée pour chaque anticorps du panel des monocytes. En fonction des recommandations contenue dans chaque fiche technique des anticorps, 5 dilutions différentes ont été testées (voir tableau 12).

Pour chaque titration de l'anticorps, une fenêtre est placée au milieu des populations positives et négatives comme on peut le voir sur la figure 14a. Pour chaque dilution, le « Stain Index » (SI) est calculé. Grâce au report du SI de chaque dilution sur un graphique, le choix de la dilution adéquate a été réalisé (figure 14b).

Dans le cas du HLA-DR, la dilution de 1,5 µl a été choisie car après cette dilution, le SI commence à diminuer, ce qui signifie qu'il y a une perte de résolution entre les deux populations.

Ainsi, les dilutions reprises dans le tableau 13 ont été choisies pour tous les anticorps.

1.2.3 FMO

Les FMO sont les dernières étapes avant de terminer la création du panel. Par exemple, pour la FMO de HLA-DR, les PBMCs ont été marqués avec tous les anticorps du panel sauf HLA-DR. Ainsi, sur la figure 15, on peut observer le résultat de la FMO du HLA-DR.

Comme dans le panel précédent, grâce au placement des différentes fenêtres, une stratégie de gating définitive a pu être créée.

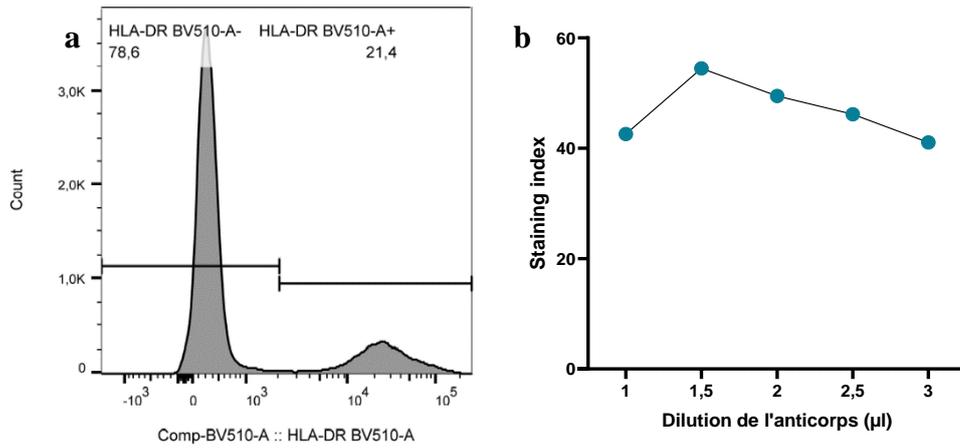


Figure 14 : Titration de l'anticorps ciblant HLA-DR. (a) Histogramme représentant une population cellulaire négative au HLA-DR à gauche et à droite une population positive. (b) Graphique rapportant chaque SI de chaque dilution d'anticorps.

Anticorps	Concentrations choisies
CD3	2 μ l
CD19	2 μ l
CD56	10 μ l
CD1d	1,5 μ l
CD16	1,5 μ l
HLA-DR	1,5 μ l

Tableau 13 : concentrations choisies pour chaque anticorps du panel des monocytes.

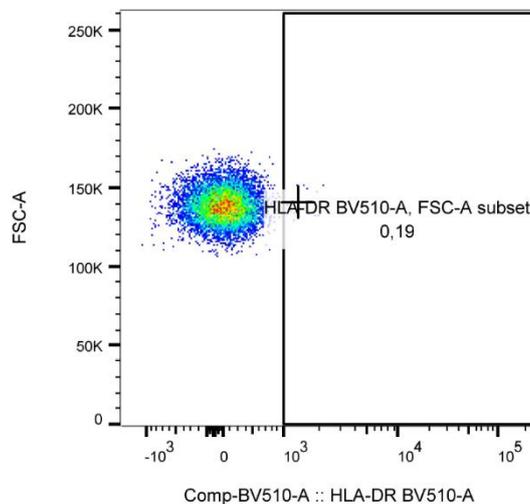


Figure 15 : FMO de l'anticorps HLA-DR.

1.2.4 Stratégie de gating

Suite aux FMO de chaque anticorps, la stratégie de gating suivante a pu être établie. Les monocytes sont sélectionnés sur base de leur taille et granulosité (figure 16a). Les doublets sont ensuite supprimés pour ne garder que les singulets (figure 16b) et grâce au marqueur de viabilité, seuls les monocytes vivants sont sélectionnés pour la suite (figure 16c). Afin d'isoler les monocytes, seules les populations cellulaires HLA-DR⁺ et CD3⁻ CD19⁻ CD56⁻ sont sélectionnées (figure 16d). Les lymphocytes et cellules NK sont alors exclus. Par après, les différentes sous-populations de monocytes (monocyte classique (CM), monocyte intermédiaire (IM) et monocyte non-classique (NCM)) peuvent être distinguées sur base de l'expression de CD14 et CD16 (figure 16e). Le CD1d est également analysé à partir des monocytes isolés en regardant sa médiane de fluorescence (figure 16f).

1.3 Panel d'anticorps pour marqueurs intracellulaires des cellules iNKT

1.3.1 Compensation

Chaque anticorps repris dans le tableau 9 a été compensé par l'ordinateur. En suivant les mêmes étapes que lors des compensations du panel II des cellules iNKT, une stratégie de gating provisoire a été créée.

1.3.2 Titration

Une titration a été effectuée pour chaque anticorps du panel intracellulaire des cellules iNKT. En fonction des recommandations contenues dans chaque fiche technique des anticorps, 5 dilutions différentes pour chaque anticorps ont été testées (voir tableau 14).

Pour chaque titration de l'anticorps, une fenêtre est placée au milieu des populations positives et négatives comme on peut le voir sur la figure 17a. Pour chaque dilution, le « Stain Index » (SI) est calculé. Grâce au report du SI de chaque dilution sur un graphique, le choix de la dilution adéquate a été réalisé (figure 17b).

Dans le cas du CD3, la dilution de 3 µl a été choisie car, après, un plateau commence à apparaître, ce qui signifie que les dilutions supérieures n'améliorent pas la discrimination des populations.

Ainsi, les dilutions reprises dans le tableau 15 ont été choisies pour tous les anticorps.

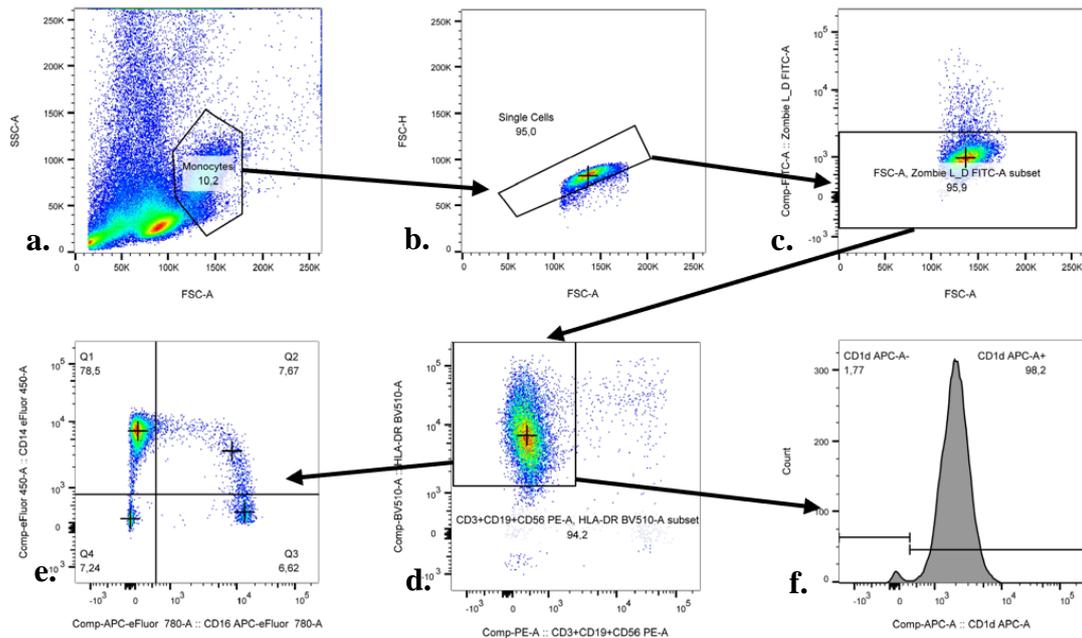


Figure 16 : Stratégie de gating du panel des monocytes utilisé afin de discriminer les monocytes ainsi que les sous-populations et le marqueur CD1d. (a) Sélection des monocytes dans les PBMCs. (b) Élimination des doublets de cellules. (c) Élimination des cellules mortes. (d) Sélection des cellules HLA-DR+ CD3- CD19- CD56-. (e) Analyse des sous-populations monocytaires (CM, IM et NCM). (f) Analyse de l'expression du CD1d.

Anticorps	Dilutions testées
CD3	1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl
Vα24Jα18	1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl
IL-4	1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl
INF-γ	1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl

Tableau 14 : Dilutions testées pour chaque anticorps du panel intracellulaire des cellules iNKT.

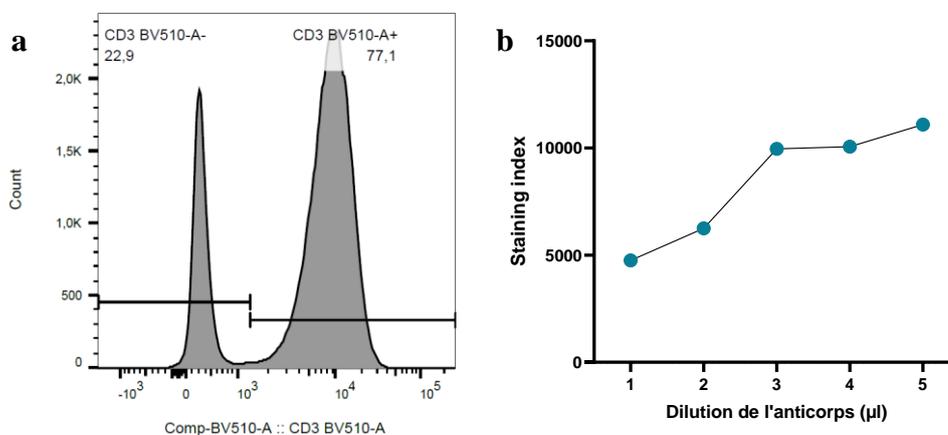


Figure 17 : Titration de l'anticorps ciblant CD3. (a) Histogramme représentant une population cellulaire négative au CD3 à gauche et à droite une population positive. (b) Graphique rapportant chaque SI de chaque dilution d'anticorps.

1.3.3 FMO

Pour terminer, des FMO ont été effectuées pour chaque anticorps. Par exemple, pour la FMO de CD3, les PBMCs ont été marqués avec tous les anticorps du panel sauf CD3. Ainsi, sur la figure 18, on peut observer le résultat de la FMO du CD3.

Comme dans la création des panels précédents, le placement d'une fenêtre à côté des populations négatives va permettre la création d'une stratégie de gating bien définie.

1.3.4 Stratégie de gating

Suite aux FMO de chaque anticorps, la stratégie de gating suivante a pu être établie. La stratégie de gating suit le même ordre que pour le panel II des cellules iNKT, sauf qu'à partir de la sélection des cellules iNKT, les deux cytokines clés des cellules iNKT (IL-4 et IFN- γ) sont ciblées (figure 19e).

Anticorps	Concentrations choisies
CD3	3 μ l
V α 24J α 18	5 μ l
IL-4	4 μ l
IFN- γ	4 μ l

Tableau 15 : concentrations choisies pour chaque anticorps du panel II des cellules iNKT.

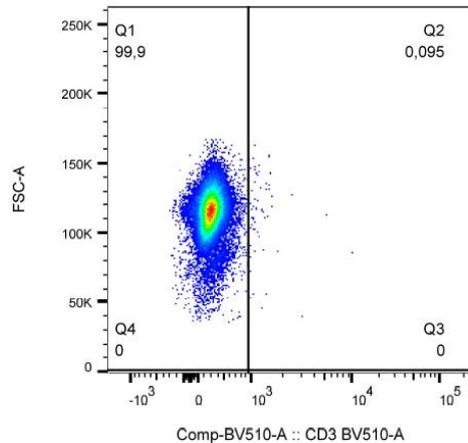


Figure 18 : FMO de l'anticorps CD3.

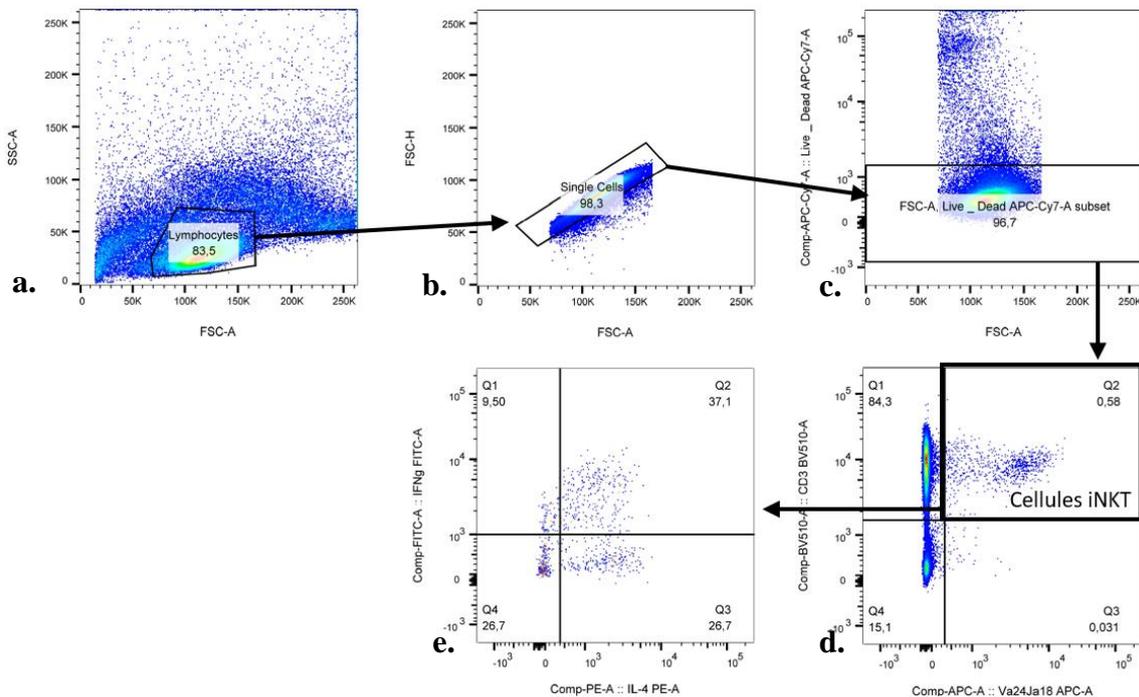


Figure 19 : Stratégie de gating du panel intracellulaire des cellules iNKT utilisé afin de discriminer les cellules iNKT ainsi que l'expression d'IL-4 et d'IFN- γ en réponse à une stimulation. (a) Sélection des lymphocytes dans les PBMCs. (b) Élimination des doublets de cellules. (c) Élimination des cellules mortes. (d) Sélection des cellules CD3+ V α 24J α 18+. (e) Analyse de la production de cytokines intracellulaires.

1.4 Autres stratégies de gating

1.4.1 Stratégie de gating du panel I des cellules iNKT

La stratégie de gating est la même que celle suivie pour le panel II des cellules iNKT mais à partir du gating des cellules iNKT, d'autres marqueurs membranaires sont analysés. Les médianes de fluorescences de PD-1, de CD25, de CD95 et de CD69 ont été analysées afin d'évaluer leur expression par les cellules iNKT (figure 20). Ce panel I avait déjà été mis au point avant mon arrivée au laboratoire.

1.4.2 Stratégie de gating du panel de prolifération

La stratégie de gating de la prolifération est la même que celle appliquée pour sélectionner les cellules iNKT, sauf que suite à la prolifération, la complexité (SSC) et la taille (FSC) des cellules ont été modifiées. Les fenêtres ont donc été adaptées par rapport au panel I des cellules iNKT afin de sélectionner toutes les cellules d'intérêt (figure 21).

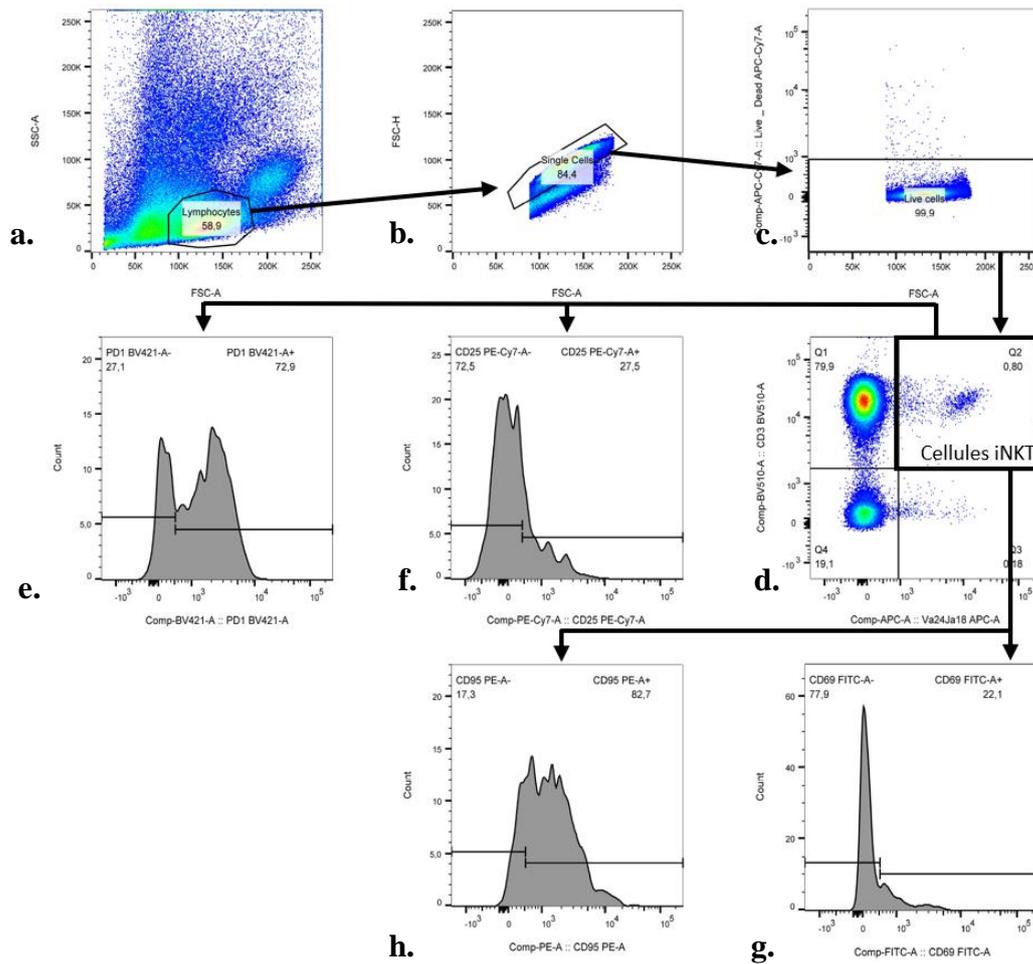


Figure 20 : Stratégie de gating du panel I des cellules iNKT utilisé afin de discriminer les cellules iNKT ainsi que les différents marqueurs exprimés par celles-ci. (a) Sélection des lymphocytes dans les PBMCs. (b) Élimination des doublets de cellules. (c) Élimination des cellules mortes. (d) Sélection des cellules CD3+ Va24J α 18+. (e-h) Analyse de l'expression de marqueurs cellulaires.

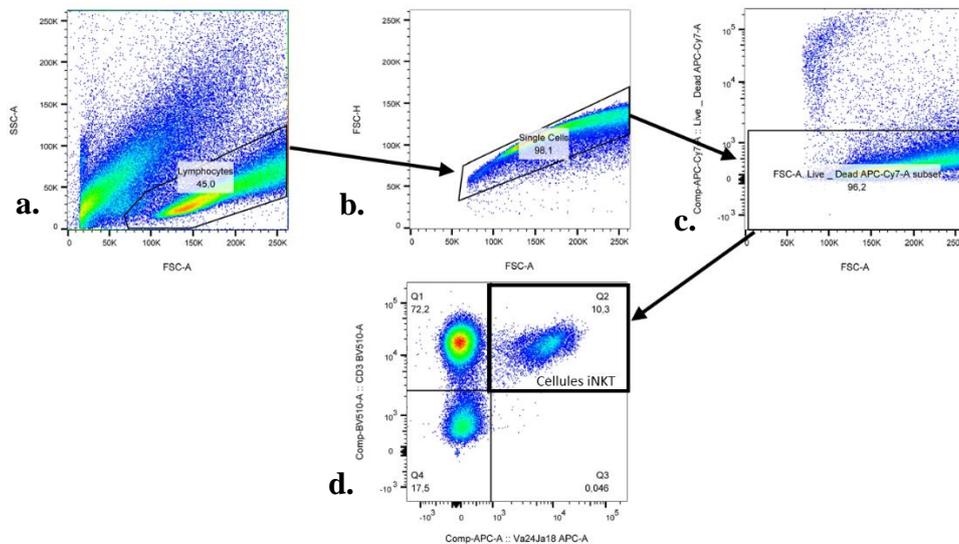


Figure 21 : Stratégie de gating du panel de prolifération utilisé afin de discriminer les cellules iNKT. (a) Sélection des lymphocytes dans les PBMCs. (b) Élimination des doublets de cellules. (c) Élimination des cellules mortes. (d) Sélection des cellules CD3+ Va24J α 18+.

2. Caractérisation des cellules iNKT des patients obèses avec ou sans intolérance au glucose

2.1 Caractéristiques anthropométriques, cliniques et biologiques des populations étudiées

Au sein du tableau 16 sont listées les différentes caractéristiques anthropométriques, cliniques et biologiques des participants à l'étude. Durant ce mémoire, 6 patients lean, 5 patients OBNG et 1 patient OBIG ont été analysés. Seules les deux premières catégories de patients (lean et OBNG) ont été comparées entre elles pour tous les résultats de ce mémoire. La dernière catégorie n'a pas pu être analysée statistiquement vu le nombre de patient dans cette catégorie trop faible (n=1). Pour chaque groupe, la moyenne du paramètre étudié ainsi que sa SD ont été calculées s'il respectait la normalité. Dans le cas contraire, la médiane et les interquartiles ont été calculés (tableau 16).

Lors du recrutement des patients, une attention particulière a été portée sur le fait d'avoir un âge moyen similaire entre chaque groupe de patients, ainsi, qu'une répartition homogène d'hommes et de femmes. Comme attendu, le poids, l'IMC ainsi que le tour de taille sont statistiquement plus élevés ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) chez les individus du groupe OBNG par rapport au groupe lean. Une augmentation de la pression artérielle systoliques ($p = 0,023$) est observée chez les patients OBNG, alors que leur pression artérielle diastolique est, quant à elle, inchangée entre les deux groupes. Concernant les paramètres métaboliques comme la glycémie à jeun, l'HbA1c et les différents types de cholestérol, aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes comparés. En ce qui concerne le taux de triglycérides, une augmentation significative est observée chez les patients OBNG par rapport aux patients lean ($p = 0,009$). Une augmentation significative ($p = 0,039$) de la CRP qui est un marqueur de l'inflammation est observée chez les obèses normo-glycémiques. Enfin, aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes pour le nombre absolu de neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles.

2.2 Caractérisation des cellules iNKT périphériques

Les cellules iNKT présentes dans le sang périphérique de chaque individu de la cohorte ont été analysées sous différents angles. Nous avons étudié leur fréquence au sein des

Caractéristiques	Lean	OBNG	OBIG
Nombre (F/H)	6 (5/1)	5 (5/0)	1 (1/0)
Age (années)	43,5 (41,5 – 47,5)	36 (34 – 58)	31 (NA)
Poids (kg)	65,95 ± 10,26	97,5 ± 10,04 **	106 ± NA
Taille (m)	1,742 ± 0,09	1,595 ± 0,06 *	1,64 ± NA
IMC (kg/m ²)	21,31 (20,72 – 22,47)	37,04 (35,37 – 41,52) **	39,41 ± NA
Tour de taille (cm)	72,5 ± 4,85	108,1 ± 11,55 ***	121 ± NA
PA systolique (mmHg)	121,5 ± 13,37	127,8 ± 9,71	110 ± NA
PA diastolique (mmHg)	72,67 ± 7,34	83,6 ± 5,6 *	76 ± NA
Glycémie à jeun (mg/dl)	90 ± 5,9	88,4 ± 7,2	87 ± NA
HbA1c (%)	5,35 (5,17 – 5,5)	5,4 (5,15 – 5,45)	6,2 (NA)
Cholestérol total (mg/dl)	183,5 ± 26,49	192,6 ± 46,72	200 ± NA
HDL (mg/dl)	69,67 ± 10,27	53,6 ± 20,23	41 ± NA
LDL (mg/dl)	100,2 ± 23,69	114,8 ± 43,78	104 ± NA
Triglycérides (mg/dl)	68,83 ± 27,13	121,6 ± 25,83 **	273 ± NA
CRP (mg/dl)	0,5 (0,5 – 4,8)	4,7 (2,5 – 12,8) *	6,2 (NA)
Neutrophiles (nombre absolu)	3,14 ± 1,46	4,46 ± 1,8	6,6 ± NA
Lymphocytes (nombre absolu)	1,7 ± 0,44	2,01 ± 0,64	3,42 ± NA
Monocytes (nombre absolu)	0,47 ± 0,16	0,51 ± 0,1	0,76 ± NA
Éosinophiles (nombre absolu)	0,14 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,22 ± NA
Basophiles (nombre absolu)	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,02 ± NA

Tableau 16 : caractéristiques anthropométriques, cliniques et biologiques des patients issus des trois groupes suivants : Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). La normalité et l'homogénéité des variances ont été vérifiées pour chacun des groupes. Si ces deux conditions sont respectées, un t test de student a été appliqué et les données sont exprimées en moyenne ± écart type. Dans le cas contraire, un test de Mann-Whitney est appliqué et dans ce cas-ci les données sont écrites sous la forme de la médiane (IQ25% - IQ75%). * p<0,05 entre Lean et OBNG, **p<0,01 entre Lean et OBNG, *** p<0,001 entre Lean et OBNG.

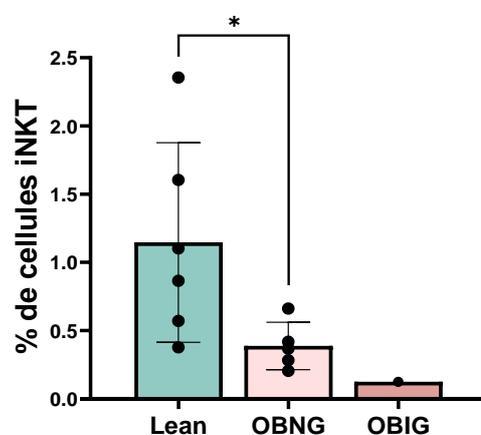


Figure 22 : Pourcentage de cellules iNKT dans la population lymphocytaire CD3+ dans les 3 groupes de la cohorte. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG). * p<0,05

lymphocytes T ainsi que leur nombre dans le sang périphérique, leur répartition entre les différentes sous-classes (CD4+, CD8+, DN), leur phénotype ainsi que leurs activités.

2.2.1 Fréquence des cellules iNKT

Premièrement, le pourcentage de cellules iNKT contenu dans la population lymphocytaire CD3+ a été calculé, puisque dans la littérature, la fréquence des cellules iNKT est généralement exprimée de cette manière. Nos résultats actuels montrent que les patients lean ont en moyenne 1,15% de cellules iNKT dans la population CD3+, alors que les OBNG en ont en moyenne 0,39% (figure 22). Le nombre de cellules iNKT diminue de façon significative ($p=0,03$) chez les patients OBNG par rapport aux patients Lean (figure 22). De plus, il est important de souligner qu'une grande variabilité interindividuelle est observée chez les patients lean. Le groupe OBNG en présente une également, néanmoins elle semble diminuée.

Ensuite, le nombre de cellules iNKT contenue dans le sang périphérique a été calculé chez chaque patient. Dans ce cas-ci, le nombre de cellules iNKT est reporté par rapport à un million de PBMCs. Les cellules iNKT sont en moyenne au nombre de 1500 cellules dans un million de PBMCs chez les individus lean. Par contre, chez les OBNG, on retrouve environ 750 cellules iNKT pour un million de PBMCs. Les cellules iNKT auraient une tendance à diminuer ($p=0,082$) chez les OBNG par rapport aux patients lean (figure 23).

2.2.2 Caractérisation des sous-populations de cellules iNKT

A partir des PBMCs isolés de patients, le pourcentage des cellules iNKT appartenant à chacune des sous populations suivantes a été analysé : CD4+, CD8+ et double négative (CD4-CD8-). Les pourcentages de ces sous-populations ne sont pas différents statistiquement en fonction du groupe de sujet. En effet, les pourcentages de cellules iNKT CD4+ sont relativement constants ($p=0,8$) entre les patients lean et les OBNG, de même pour les pourcentages de cellules iNKT CD8+ ($p=0,96$) et DN ($p=0,69$) (figure 24).

2.2.3 Phénotypage des cellules iNKT totales et des sous-populations de cellules iNKT

Les cellules iNKT ont été analysées aux niveaux de nombreux marqueurs membranaires afin de déterminer si l'obésité et/ou l'intolérance au glucose pouvait avoir un impact sur leur expression. Dans cette série de marqueurs, on retrouve le CD25 (marqueur d'activation tardive), le CD69 (marqueur d'activation précoce), le CD95 (marqueur d'apoptose), le PD-1 (marqueur d'épuisement), le CD56 (marqueur d'activation des cellules NK), le CD161 (marqueur de maturation et d'activité) et le NKG2D (marqueur de cytotoxicité).

L'expression des différents marqueurs cellulaires a été analysée de deux manières différentes. Tout d'abord, nous avons examiné le pourcentage de cellules iNKT exprimant ces

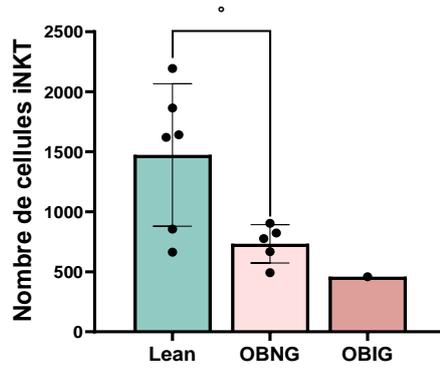


Figure 23 : Nombre de cellules iNKT dans le sang périphérique pour les 3 groupes de la cohorte. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG). $p < 0,1$

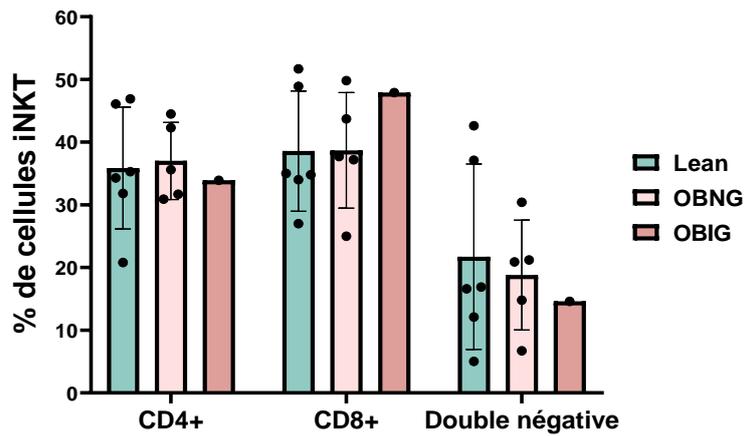


Figure 24 : Pourcentage de cellules iNKT dans chaque sous-population CD4+, CD8+ et DN pour les 3 groupes de la cohorte. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG).

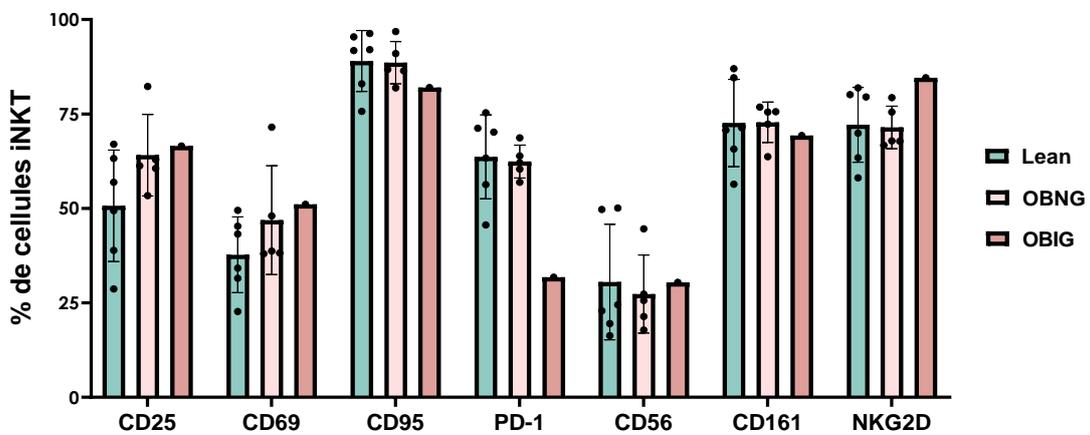


Figure 25 : Pourcentages de cellules iNKT exprimant différents marqueurs membranaires. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG) pour CD25, CD95, PD-1, CD161 et NKG2D. Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG) pour CD69 et CD56.

marqueurs et n'avons observé aucune différence significative entre les individus OBNG et les patients lean (figure 25). Toutefois, le pourcentage de cellules iNKT positives pour les marqueurs d'activation tardive (CD25) et précoce (CD69) semble légèrement augmenter de manière non significative chez les OBNG par rapport aux patients lean (figure 25).

La deuxième analyse de l'expression de ces marqueurs se base sur la mesure de la médiane de fluorescence. Cela veut dire que plus il y a des marqueurs cellulaires exprimés par les cellules iNKT, plus l'intensité de la fluorescence émise sera importante et donc plus la médiane sera élevée. L'expression de chaque marqueur sur les cellules iNKT ne montre pas de différence significative entre les deux groupes comparés (figure 26). Toutefois, l'expression du CD25 et de NKG2D semble être légèrement augmentée de manière non significative chez les obèses par rapport aux patients lean (figure 26).

Ensuite, l'expression du CD56, du CD161 et du NKG2D a été analysée dans les 3 sous-populations de cellules iNKT. On peut observer que ces marqueurs ne sont pas exprimés de la même manière dans les trois sous-populations d'iNKT ; ce sont les cellules iNKT DN qui expriment le plus le marqueur de maturation CD161 tandis que le marqueur de cytotoxicité NKG2D est plus abondant sur les deux sous-populations CD8+ et DN (figures 27b, c). Dans chaque sous-population de cellules iNKT, l'expression du CD56 (figure 27a), du CD161 (figure 27b) et de NKG2D (figure 27c), n'est pas modifiée chez les patients OBNG par rapport aux patients lean.

Pour finir avec ces marqueurs cellulaires, une dernière analyse a été faite. L'expression du CD56, du CD161 et de NKG2D est quantifiée au sein des différentes catégories de cellules iNKT. Dans le cas du CD56 (figure 28a) et du CD161 (figure 28b), aucune différence n'a été décelée entre les OBNG et les patients lean dans les sous-populations. Par contre, dans la sous-population CD8+, le marqueur NKG2D tend à augmenter ($p=0,064$) chez les OBNG par rapport aux patients lean. La même tendance ($p=0,052$) est observée chez les cellules iNKT DN de patients OBNG pour l'expression de NKG2D (figure 28c). De plus, l'expression du CD161 semble augmentée en générale dans les DN par rapport aux autres sous-populations alors que celle de NKG2D semblent plus forte dans les CD8+ et DN que dans les CD4+.

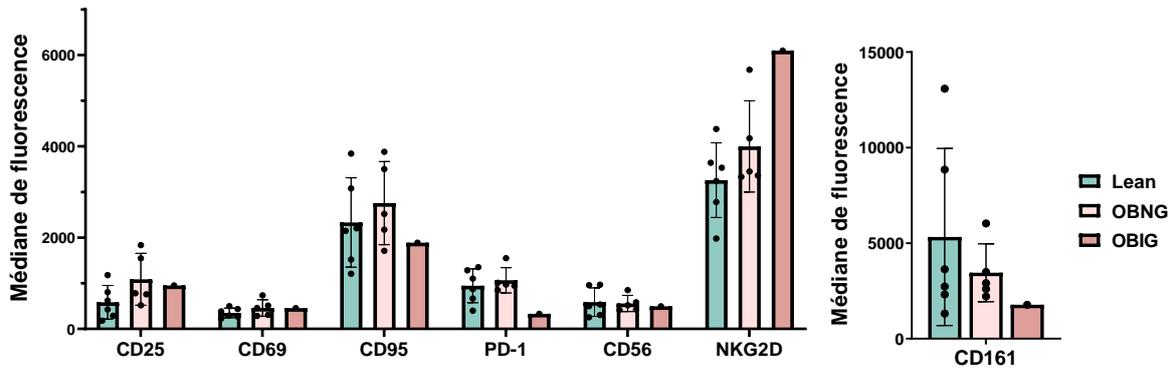


Figure 26 : Quantification de l'expression des différents marqueurs cellulaires par les cellules iNKT. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG) pour CD25, CD69, CD95, CD56 et CD161. Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG) pour PD-1 et NKG2D.

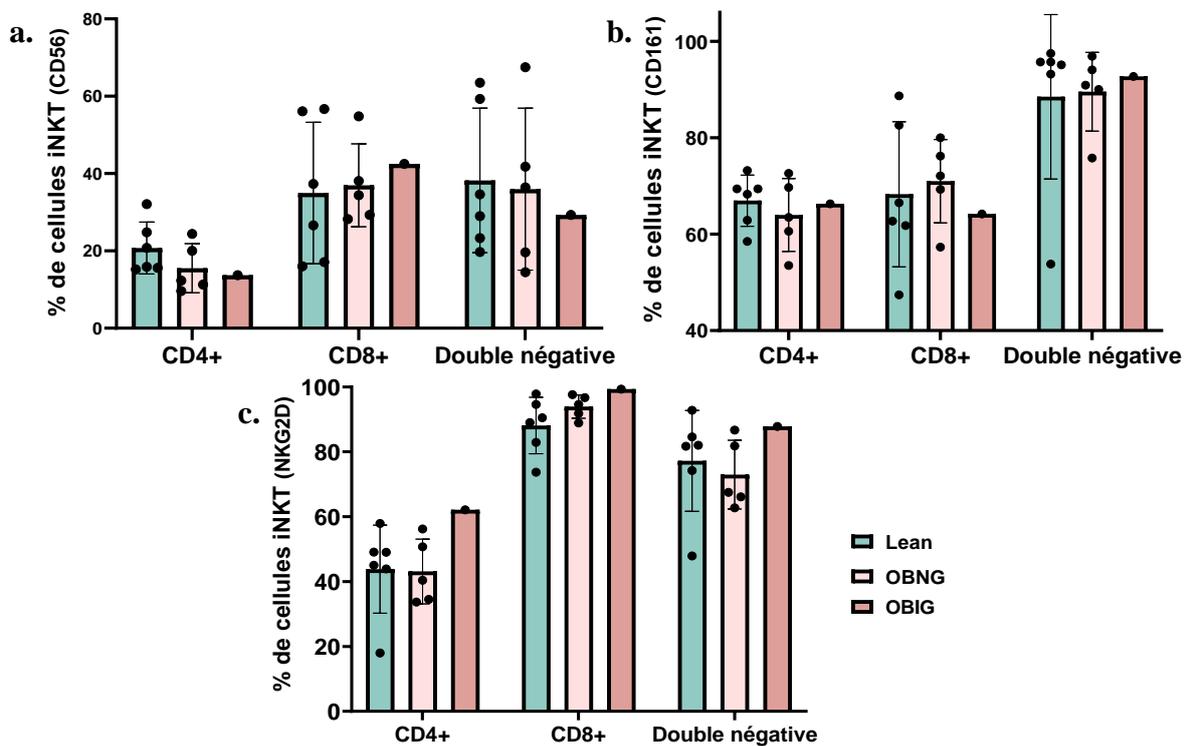


Figure 27 : Pourcentages des cellules iNKT CD56+ (a), CD161+ (b) et NKG2D+ (c) dans chaque sous-population CD4+, CD8+ et DN. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student pour CD4+, CD8+ et DN (CD56), CD4+ et CD8+ (CD161) et CD4+, CD8+ et DN (NKG2D). Test de Mann-Whitney pour DN (CD161).

2.2.4 Évaluation de l'activité des cellules iNKT

L'activité des cellules iNKT a été analysée de deux manières; nous avons, d'une part, évalué leur prolifération en réponse à la présentation d'antigènes lipidiques et d'autre part, la production de cytokines après une stimulation PMA-Ionomycine.

Analyse de la capacité de prolifération des cellules iNKT

Pour analyser la capacité de prolifération des cellules iNKT, les PBMCs isolés de patients ont été mis pendant 7 jours dans un milieu enrichi en IL-2 et en α -GalCer, propice à la survie et à la prolifération des cellules iNKT. Le taux de prolifération a été estimé en calculant les rapports entre le nombre de cellules iNKT après 7 jours (J7) de culture et la quantité initiale de cellules iNKT (J0). Comme attendu, lorsque les cellules iNKT ne sont pas dans un milieu favorable à la prolifération, leur nombre diminue (ratio <1) et aucune différence (p=0,78) entre les groupes lean et OBNG n'est observée (figure 29a).

Concernant les cellules iNKT mises dans le milieu IL-2 et α -GalCer, une prolifération est observée chez tous les patients de chaque catégorie (figure 29b). Le nombre de cellules iNKT est multiplié en moyenne par 45 chez les individus lean et seulement par 17 chez les patients OBNG. Toutefois, cette différence reste statistiquement non significative (p>0,99).

Analyse de la production de cytokines suite à une stimulation des cellules iNKT

Deux cytokines ont été analysées par marquage intracellulaire; une cytokine Th2, l'IL-4 et une cytokine Th1, l'IFN- γ . Concernant, les cellules iNKT non stimulées avec la PMA-ionomycine, une production d'IL-4 mais pas d'IFN- γ est observée chez tous les patients (figure 30). Par contre, lors de la stimulation avec de la PMA-ionomycine (4h), des cellules iNKT produisant à la fois de l'IL-4 et de l'IFN- γ sont observées dans les deux groupes de patients (figure 30). Cependant, le pourcentage de cellules iNKT produisant de l'IFN γ est nettement plus faible chez les patients obèses comparativement aux individus lean (figure 30).

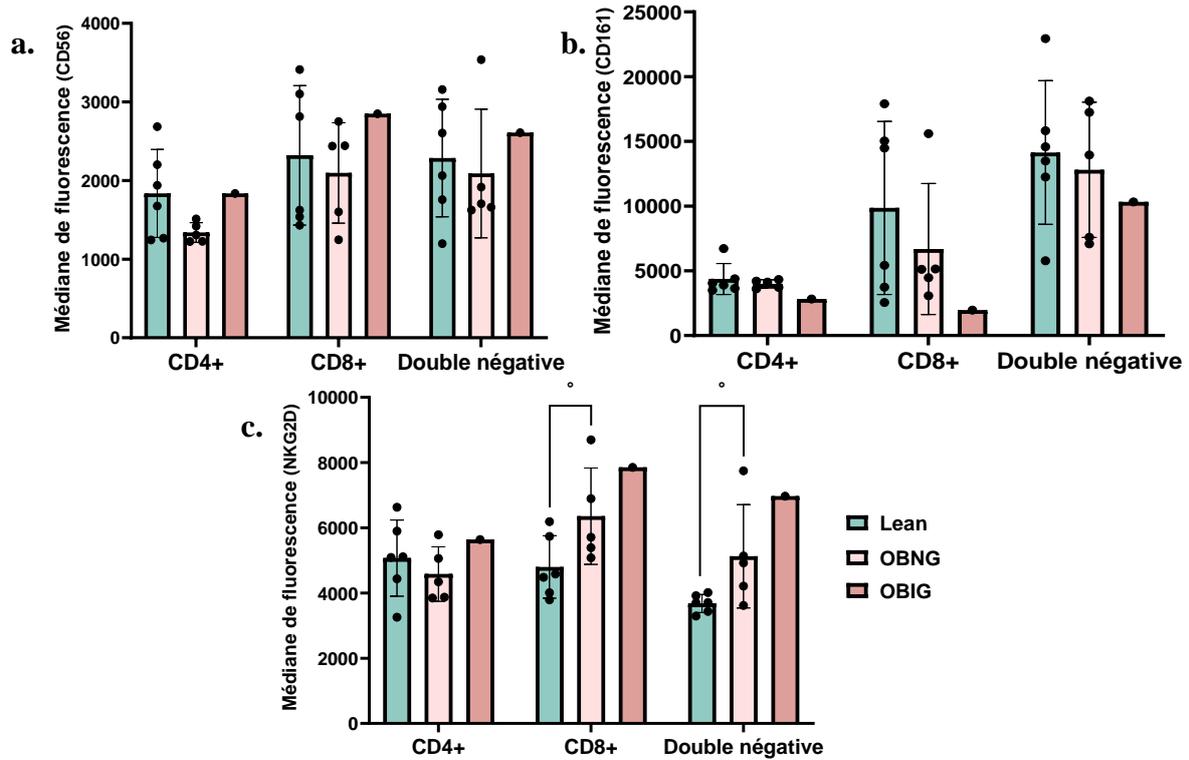


Figure 28 : Quantification de l'expression du CD56 (a), CD161 (b) et NKG2D (c) dans les sous-populations de cellules iNKT. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG) pour CD8+ (CD56), DN (CD161) et CD4+ et CD8+ (NKG2D). Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG) pour CD4+ et DN (CD56), CD4+ et CD8+ (CD161) et DN (NKG2D). ° p<0,1

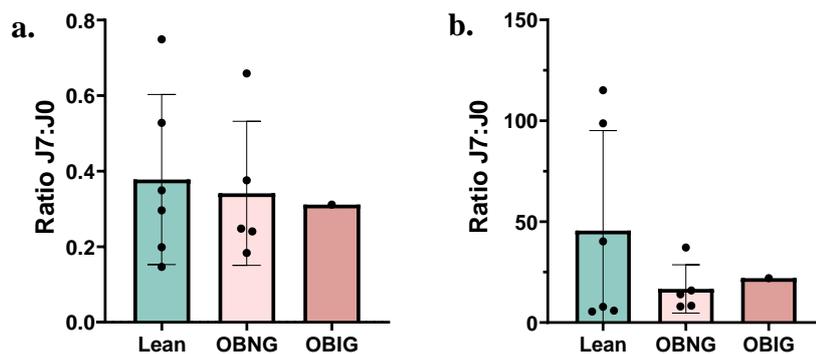


Figure 29 : Prolifération des cellules iNKT. (a) Ratio du nombre de cellules iNKT mises dans un milieu non stimulant sur le nombre de cellules iNKT au jour 0. (b) Ratio du nombre de cellules iNKT mises dans un milieu stimulant sur le nombre de cellules iNKT au jour 0. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG) pour la condition non stimulée. Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG) pour la condition stimulée.

Concernant l'analyse statistique de ces données dans la condition non stimulée, la proportion de cellules iNKT ne produisant aucune des deux cytokines (US-IL4-/IFN γ -) est diminuée significativement ($p=0,0015$) chez les patients OBNG par rapport aux patients lean. Cependant, la proportion de cellules iNKT exprimant de l'IL-4 mais pas d'IFN- γ (US-IL4-/IFN γ -) est augmentée significativement ($p=0,0016$) chez les OBNG. Et la population exprimant les deux cytokines (US-IL4+/IFN- γ +) montre une tendance à l'augmentation ($p=0,069$) chez ce même groupe par rapport aux patients lean (figure 31).

Ensuite, les cellules iNKT stimulées à la PMA-ionomycine montrent quelques différences en fonction des groupes de la cohorte. Comme dans la condition non stimulée, une augmentation significative ($p=0,015$) est observée dans la population de cellules iNKT produisant uniquement de l'IL-4 (PMA-iono-IL4+/IFN- γ -) chez les OBNG. De plus, les patients lean semblent avoir une proportion plus importante ($p=0,062$) de cellules iNKT produisant les deux types de cytokines (PMA-iono-IL4+/IFN- γ +) . Cependant, les pourcentages de cellules iNKT ne produisant aucune cytokine (PMA-iono-IL4-/IFN- γ -) et seulement l'IFN- γ (PMA-iono-IL4-/IFN- γ +) semblent similaires dans les deux groupes (figure 31).

3. Caractérisation des monocytes

Les monocytes provenant du sang périphérique des patients de la cohorte ont été analysés afin de déceler ou non une différence dans la répartition des monocytes dans leurs sous-populations en fonction du groupe d'appartenance de l'individu. De plus, l'expression du CD1d au niveau des monocytes a été analysée afin de confirmer les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire d'immuno-métabolisme et de nutrition.

3.1 Caractérisation des sous-populations monocytaires

A partir des PBMCs isolés du sang périphérique des patients, le pourcentage de monocytes dans chaque population a été analysé au FACS grâce aux marqueurs membranaires spécifiques de chaque population : CM (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$), IM (CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$) et NCM (CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$) (figure 32). Pour chaque sous-population, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les individus OBNG et les individus lean. Les CM sont retrouvés en plus grand nombre dans le sang périphérique par rapport aux autres sous-populations, en effet ils représentent en moyenne 86 % des monocytes périphériques. Au contraire, les IM et NCM sont retrouvés en très petites quantités, respectivement 5% et 7%.

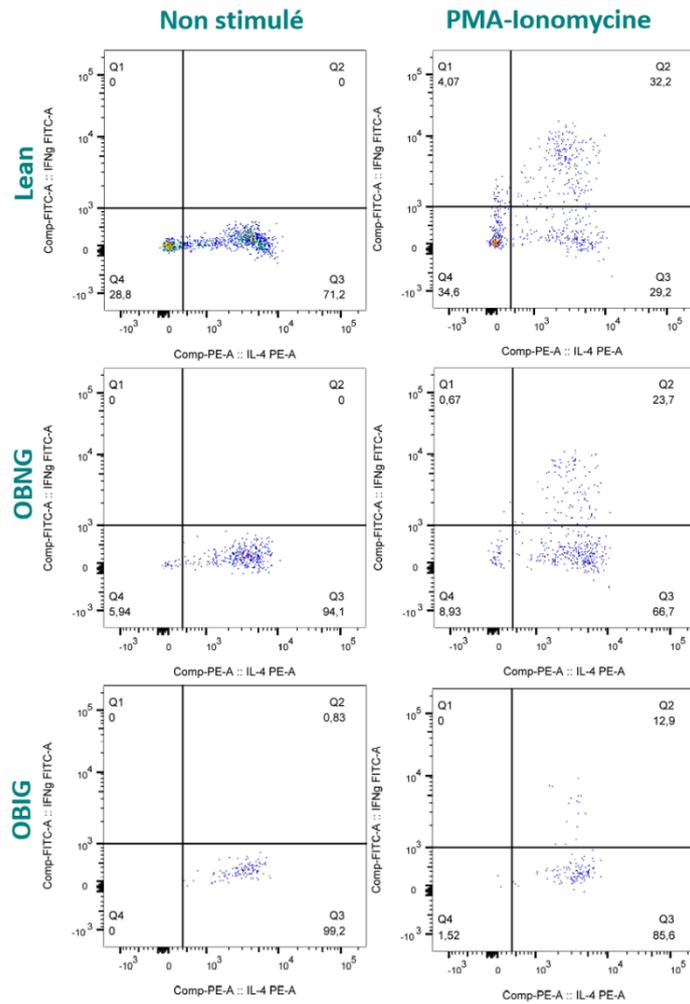


Figure 30 : Analyse par cytométrie en flux de la production d'IL-4 et d'IFN- γ suite à une stimulation ou non par de la PMA-ionomycine (4h) dans les différentes catégories de patients. Expérience représentative.

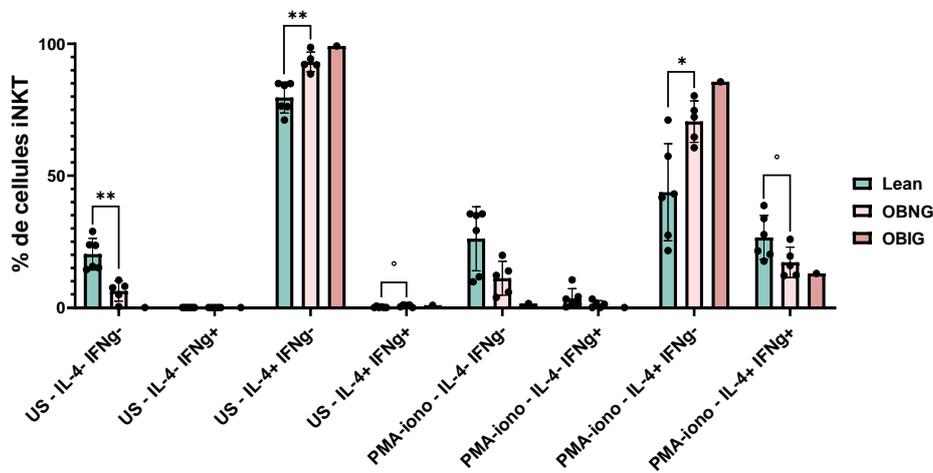


Figure 31 : Production de cytokines (IL-4 et IFN- γ) par des cellules iNKT suite à une stimulation à la PMA-ionomycine ou non. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG) pour US (IL-4- IFN- γ -, IL-4- IFN- γ +, IL-4+ IFN- γ -) et PMA-iono (IL-4- IFN- γ -, IL-4- IFN- γ +, IL-4+ IFN- γ -, IL-4+ IFN- γ +) . Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG) pour US (IL-4+ IFN- γ +) . \circ p<0,1 ; * p<0,05 ; ** p<0,01

3.2 Expression du CD1d

Comme énoncé précédemment, notre laboratoire a montré, sur une première cohorte, que l'expression du CD1d était augmentée à la surface des monocytes des patients OBIG par rapport aux patients lean et OBNG. Pour confirmer cela, l'expression du CD1d est également analysée dans cette cohorte. Le niveau d'expression du CD1d sur les monocytes semble constant entre les deux groupes de patients dans les différentes sous-populations monocytaires et lorsqu'on regarde la population totale (figure 33).

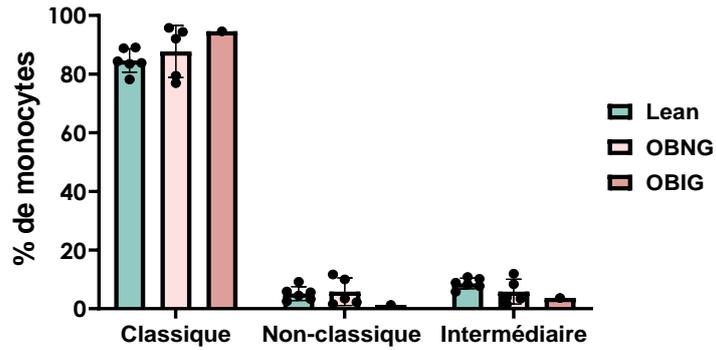


Figure 32 : Répartitions des monocytes dans les 3 sous-populations monocytaires : classique, non-classique et intermédiaire en fonction des 3 groupes de patients. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG).

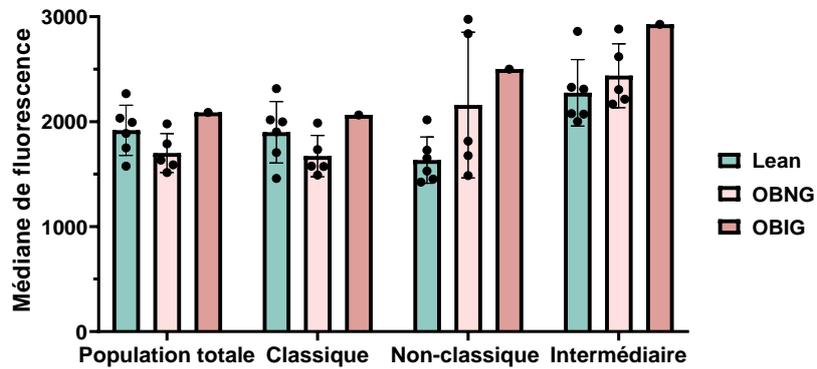


Figure 33 : Expression du CD1d par les monocytes et plus particulièrement dans les 3 sous-populations. Lean (n=6), OBNG (n=5) et OBIG (n=1). T test de student (Lean vs OBNG) pour population totale, CM et IM. Test de Mann-Whitney (Lean vs OBNG) pour NCM.

Discussion et Conclusion

L'obésité est, de nos jours et de plus en plus, un sujet de préoccupation important, car sa prévalence ne cesse d'augmenter. De plus, elle est associée à de nombreuses comorbidités comme des maladies métaboliques, cardiovasculaires et certains cancers¹³. Il a été démontré qu'au sein de l'obésité, on observait une perte d'immuno-surveillance qui rendrait les individus plus vulnérables face à des infections et certains cancers. Le développement de ce dysfonctionnement peut provenir de différentes causes, par exemple, une altération de l'architecture des tissus lymphoïdes est observée chez les obèses. Une augmentation du dépôt de graisse y est observée provoquant une altération de la répartition des populations de leucocytes et de l'activité lymphocytaire¹². Par ailleurs, un dysfonctionnement de diverses cellules immunitaires a été mis en évidence chez des individus obèses, telles que les cellules NK. Dans l'obésité, les cellules NK se retrouvent dans un milieu riche en lipide, elles en intègrent ce qui va causer une modulation dans leur métabolisme. Cette modulation va, in fine, créer une paralysie de leurs fonctions cytotoxiques^{12,32}. Par ailleurs, les cellules iNKT semblent également touchées par l'obésité et nous nous sommes donc intéressés plus en détail à ce type cellulaire. Ces cellules sont définies comme étant une population non conventionnelle de la lignée des LT exprimant des récepteurs caractéristiques de la lignée des LT et de la lignée des cellules NK, tel que le CD3 et le CD161, respectivement³⁵. Elles jouent un rôle central en faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative, grâce à leur capacité à sécréter de manière très rapide et importante des cytokines³⁶.

Des résultats préliminaires du laboratoire obtenus sur une précédente cohorte ont démontré une expression plus importante du CD1d sur les monocytes ainsi qu'une modulation du phospholipidome des PBMCs chez les patients OBIG par rapport aux individus OBNG et lean. Par conséquent, l'hypothèse suivante a été proposée : les monocytes d'individus OBIG présenteraient certains antigènes (glyco)lipidiques spécifiques à ces individus via leur CD1d aux cellules iNKT. Une activation chronique des cellules iNKT par ces lipides provoquerait leur épuisement et/ou leur apoptose, ce qui pourrait contribuer à la perte d'immunosurveillance observée chez ces patients. Pour évaluer cette hypothèse, le premier objectif consistait à : étudier l'impact de l'obésité avec ou sans intolérance au glucose sur le phénotype et l'activité des cellules iNKT périphériques en lien avec l'expression du CD1d sur les monocytes. Dans ce but, une cohorte comportant trois catégories de patients a été initiée (mince (lean), obèse normoglycémique (OBNG) et obèse intolérant au glucose (OBIG)).

Lors de la rédaction de ce travail, les groupes de la cohorte étaient appariés au niveau de l'âge et du sexe des patients pour les groupes « lean » et OBNG. À propos du groupe OBIG,

seul 1 patient a été recruté lors de ma contribution à l'étude, aucune analyse n'a donc pu être effectuée sur ce groupe. Comme attendu, une augmentation significative de l'IMC est observée chez les patients obèses par rapport aux patients lean. Concernant les patients OBNG, aucune différence au niveau de leur glycémie à jeun et de l'hémoglobine glyquée n'est observée en comparaison avec les patients lean, confirmant que les patients lean et OBNG ne présentent pas de problème de glycémie. En revanche, pour le seul patient OBIG recruté, son HbA1c était bien au-dessus de la norme (6,2 %), mais étonnamment sa glycémie à jeun était inférieure aux valeurs de référence. Cela peut s'expliquer par le fait que ce patient est venu à jeun dans l'après-midi. Étant à jeun depuis la veille au soir, sa glycémie a chuté à des valeurs basses, ne reflétant pas sa glycémie à jeun matinale (observée sur d'autres prises de sang). De plus, une augmentation du taux de triglycérides ainsi que de la CRP est observée chez les OBNG en comparaison aux patients lean. Il est tout à fait logique de voir ces deux paramètres sanguins augmenter chez des individus obèses ; une corrélation significative a été démontrée dans la littérature entre ce paramètre et l'IMC car les triglycérides reflète les niveaux d'adiposité⁹⁰. Il a également été démontré à maintes reprises que la CRP était augmentée chez les obèses ; il n'est pas étonnant de voir une augmentation de ce marqueur inflammatoire chez ces individus où une inflammation chronique de bas grade est présente⁹¹.

Le bilan sanguin effectué chez les patients de chaque catégorie a permis d'analyser le nombre de cellules immunes présentes dans leur sang périphérique. Que ce soient les monocytes, basophiles, éosinophiles, neutrophiles ou lymphocytes, aucune différence n'a été observée entre les patients lean et les OBNG. Dans la littérature, on retrouve beaucoup d'article se contredisant sur le nombre de ces différentes populations immunitaire. En effet, dans une étude, il est décrit qu'une augmentation du nombre absolu des monocytes peut être observée chez les individus obèses. Alors que d'autres études ne montrent aucune différence ou une diminution du nombre de monocytes entre les patients obèses et lean^{79,92}. Le nombre de patients dans chaque groupe de patients étant insuffisant, lors de la rédaction de ce mémoire, pourrait expliquer pourquoi aucune différence entre les patients lean et les obèses n'est actuellement visible.

Lors de l'analyse du pourcentage de cellules iNKT dans la population de cellules CD3+, nous avons observé une diminution significative de ce pourcentage chez les patients obèses. De plus, le nombre de cellules iNKT a également tendance à diminuer dans un million de PBMCs chez les obèses par rapport aux patients lean. Ces résultats observés sont en accord avec la littérature⁶¹. Néanmoins, ces résultats sont actuellement uniquement observés chez les OBNG.

Cependant, nous nous attendons à observer une diminution plus prononcée chez les OBIG par rapport aux OBNG. Cette hypothèse pourra être confirmée ou infirmée lorsque plus de patients seront recrutés dans la catégorie OBIG. Si une diminution plus importante est effectivement observée chez les OBIG, cela montrerait qu'une déplétion des cellules iNKT est associée à l'obésité mais que l'intolérance au glucose joue également un rôle. En revanche, au niveau de la répartition des cellules iNKT dans les différentes sous-populations CD4+, CD8+ et DN, on observe aucune différence entre les patients lean et les obèses. Dans le cadre d'autres maladies, des modifications dans cette répartition ont déjà été observées ; par exemple, une étude a démontré que la sous-population CD4+ était diminuée chez les patients atteints du DT1⁹³. Dans ce contexte où la cohorte n'est pas finie, il est trop prématuré pour conclure que l'obésité n'engendre pas de changement de la répartition des cellules iNKT dans les sous-populations.

Lors du phénotypage des cellules iNKT, aucune différence significative dans les pourcentages de cellules iNKT exprimant les différents cellulaires analysés n'a pu être observée entre les obèses et les patients lean. Cependant, on peut tout de même observer, même si ce n'est pas significatif, une légère augmentation de la proportion des cellules iNKT exprimant le CD25 et le CD69 chez les obèses. Ce qui est tout à fait intéressant, ce sont tous deux des marqueurs d'activation, respectivement, tardif (pic d'expression après 4 jours) et précoce (pic d'expression après 24h)^{45,94}. Si les cellules iNKT de patient expriment un ou deux marqueurs cela signifie qu'elles ont été activées il y a plus ou moins longtemps. Donc, si une augmentation significative de ces deux marqueurs est observée chez les obèses, ceci montrerait que les cellules iNKT d'obèses sont potentiellement plus fréquemment activées que celles des patients lean. Dans la littérature, on retrouve une étude portant sur l'expression du CD25 et du CD69 sur les cellules iNKT dans des échantillons humains de sang et de tissu adipeux d'individus minces et obèses. Ils ont observé une augmentation de l'expression du CD25 et du CD69 à la surface des cellules iNKT au sein des deux types d'échantillons, ainsi qu'une corrélation positive de cette augmentation avec l'intolérance au glucose. Il serait également intéressant de voir si une augmentation de ces deux marqueurs est également visible au niveau des OBIG et si cette activation serait plus forte.

Concernant la quantification de l'expression des différents marqueurs à la surface des cellules iNKT (MFI), aucune différence statistique n'a été mise en évidence pour le moment. Cependant, une légère augmentation non significative de l'expression du CD25 et du NKG2D est observée chez les OBNG par rapport aux patients lean. Le marqueur cellulaire NKG2D est à la fois un marqueur d'activation de l'activité de cytolyse des cellules iNKT indépendant du

TCR et aussi une molécule de costimulation du CD1d³⁹. Une étude sur du sang périphérique et du TA de patients obèses et lean a démontré une augmentation de l'expression de NKG2D au niveau des cellules NK de patients obèses suggérant que l'état inflammatoire retrouvé dans l'obésité active les cellules NK⁹⁶. Bien que les cellules iNKT ne soient pas des cellules NK, il se pourrait que les cellules iNKT se comportent comme les cellules NK pour l'expression du NKG2D, la légère augmentation observée nous pousse à le supposer. Par contre, une seconde étude a montré que cette augmentation d'expression de NKG2D dans les cellules NK n'influçait pas le développement de la résistance à l'insuline et de l'inflammation retrouvée dans l'obésité. Toutefois, l'interaction entre NKG2D et ses ligands (MICA/MICB) permettrait le recrutement de LT CD8+ au sein du TA durant l'obésité⁹⁷. L'étude de l'expression de NKG2D dans le contexte de l'obésité semble intéressante pour le recrutement d'autres cellules immunitaires.

Enfin, le CD56, CD161 et NKG2D ont été analysés dans les différentes sous-populations de cellules iNKT. Quoiqu'aucune différence ne soit observée dans le pourcentage de cellules iNKT exprimant les marqueurs entre les différents groupes de patients, il semble y avoir plus de cellules iNKT DN qui expriment le CD161 par rapport aux cellules CD4+ et CD8+. Le CD161 est un marqueur d'activation et de maturation, ce marqueur est souvent étudié dans le cadre de maladies auto-immunes où le CD161 est utilisé pour analyser la maturité des cellules iNKT. Dans ces études, il est généralement observé une diminution de l'expression du CD161 à la surface des cellules iNKT de patients présentant, par exemple, le DT1⁹⁸. Ces études ont démontré une association entre ces cellules iNKT n'exprimant pas le CD161 et le dysfonctionnement du SI. Du côté de l'expression de NKG2D, on observe qu'il y a plus de cellules iNKT CD8+ et DN exprimant NKG2D que des CD4+, ce qui est en accord avec le rôle cytotoxique de ces cellules³⁸. En effet, NKG2D est un marqueur de cytotoxicité, il est donc logique qu'il soit plus exprimé dans ces deux populations. De plus, au niveau de la quantification de l'expression des 3 marqueurs cellulaires dans les sous-populations, on observe que l'expression de NKG2D a tendance à augmenter dans les populations CD8+ et DN chez les obèses par rapport aux lean. Lors de l'établissement de la cohorte, il sera donc intéressant de regarder si cet écart donne une différence statistique, ce qui montrerait un phénotype plus cytotoxique des cellules iNKT chez les patients obèses.

Une des caractéristiques définissant les cellules iNKT est la production rapide et en grande quantité de cytokines⁴⁷. Deux cytokines clés, une cytokine Th2, l'IL-4 et une cytokine Th1, l'IFN- γ , sont le plus souvent étudiées. Il est connu dans la littérature que ces deux

cytokines ont deux cinétiques différentes et que les cellules iNKT expriment de manière constitutive de l'IL-4. Dès lors, la stimulation des cellules iNKT conduit à une sécrétion rapide d'IL-4 alors que celle d'IFN- γ est retardée^{99,100}. Concernant la condition où les cellules iNKT n'ont pas été stimulées par de la PMA-ionomycine, comme attendu, seule une expression d'IL-4 est observée. Quand on compare les OBNG aux patients lean, plus de cellules iNKT de patient OBNG (voir presque la totalité) produisent de l'IL-4 en comparaison aux patients lean. Cette augmentation de la production d'IL-4 chez les cellules iNKT a déjà été observée dans le TA de souris²⁹. Il n'est pas évident de comprendre pourquoi les cellules de patient obèse exprimeraient plus d'IL-4, peut-être que les cellules iNKT de patients obèses étant dans des conditions de stimulation chronique causent une production d'IL-4 plus importante dans le but d'essayer de réguler l'inflammation retrouvée chez ces patients. Ensuite, lorsque les cellules iNKT ont été stimulées par de la PMA-ionomycine, on observe à la fois une production d'IL-4 et d'IFN- γ dans chaque groupe. Toutefois, il y a plus de cellules iNKT chez les patients lean exprimant de l'IFN- γ en comparaison aux patients OBNG. De plus, on observe chez les lean une proportion beaucoup plus importante, que chez les OBNG, de cellules iNKT exprimant à la fois de l'IL-4 et de l'IFN- γ . Tout ceci semble être en accord avec la littérature, en effet, lors d'une étude sur les cellules iNKT du TA de souris, il a été observé une expression plus importante d'IL-4, ainsi qu'une production moins importante d'IFN- γ par les cellules iNKT²⁹. Les individus obèses auraient potentiellement de moins bonnes capacités à répondre à une stimulation en produisant de l'IFN- γ . Dans ces résultats, seul un patient OBIG est représenté, mais il semble montrer les mêmes résultats que les OBNG, mais de manière plus amplifiée.

Il a été démontré dans des études que l'obésité influençait la répartition des monocytes dans les différentes sous-populations monocytaires. Beaucoup de ces études se contredisent par rapport à cette répartition. En général, la proportion des monocytes classiques (CM) se voit diminuer en faveur d'une augmentation de la proportion des monocytes non-classique (NCM). Les monocytes intermédiaires, eux, sont égaux ou augmentés selon l'étude^{75,101}. Dans le cadre de notre étude, aucune différence n'est observée dans les différentes sous-populations en fonction du groupe d'appartenance des patients. Il se peut qu'encore une fois, le nombre de patients dans chaque catégorie ne soit pas assez important pour observer une différence se marquer. Les NCM et IM sont connus pour avoir des activités plutôt pro-inflammatoires de par la production de cytokines pro-inflammatoires⁷⁷. Si ces deux catégories sont augmentées chez les individus obèses et d'autant plus chez les OBIG, elles pourraient jouer un rôle dans le développement de l'inflammation chronique. Une étude assez récente a montré que les obèses

présentaient un nombre plus élevé de CM et IM mais par contre, que les obèses intolérants au glucose avaient plus d'IM et de NCM¹⁰². Cependant, il semble compliqué d'étudier ces différentes populations chez les obèses, beaucoup d'études se contredisent encore actuellement. Pour terminer, l'expression du CD1d a été analysée au sein des sous-populations monocytaires. En raison des résultats obtenus lors de la cohorte précédente, nous nous attendons à voir une augmentation de l'expression de ce marqueur chez les monocytes de patients obèses intolérants au glucose. Comme attendu, une expression similaire au sein des individus lean et OBNG est observée, mais malheureusement aucune différence n'est encore observée entre les OBIG et les deux autres catégories dû au seul patient présent actuellement dans cette catégorie. Par contre, il est encore complexe de prédire si cette augmentation sera vue dans chaque sous-populations de monocytes ou dans une population spécifique. En effet, l'expression du CD1d dans le cadre de l'obésité est souvent étudiée au niveau des adipocytes et non pas de monocytes^{64,103,104}.

A la suite de cette cohorte, une deuxième cohorte va être lancée dans le but de caractériser l'interaction qu'il peut y avoir entre les cellules iNKT et les monocytes. Pour caractériser cette interaction, une coculture va être créée entre des monocytes de patients lean, OBNG ou OBIG et des cellules iNKT « saines » provenant d'un stock de cellules iNKT développé au sein du laboratoire. L'objectif de cette coculture sera d'analyser si les monocytes de patients obèses activent plus fortement les cellules iNKT que les monocytes de patients lean. Il serait également intéressant d'essayer de comprendre s'il existe un antigène spécifique dans le cadre de l'obésité stimulant les cellules iNKT. Cet antigène lipidique pourrait être un antigène endogène qui serait produit par des CPA, comme les monocytes, de patients obèses ou un antigène endogène provenant du milieu extracellulaire des patients obèses intolérants au glucose qui serait endocyté et présenté par les monocytes. De plus, des analyses lipidomiques vont être effectuées sur le plasma et les monocytes, dans le but, d'observer ou non des différences entre les lean et les obèses au niveau des lipides retrouvés dans le plasma ou dans les monocytes. Enfin, un nouveau panel ciblant d'autres cytokines ainsi que la perforine et le granzyme produits par les cellules iNKT est en train d'être créé. Il mettra en évidence le TNF- α , par exemple, qui est une cytokine pro-inflammatoire produites par des macrophages ou d'autres types cellulaire¹⁰⁵. Nous nous attendons à observer une diminution de la production du TNF- α par les cellules iNKT chez les patients obèses, comme déjà observé dans le cas de l'IFN- γ .

En conclusion, en analysant les résultats des patients déjà inclus dans cette étude clinique, de nombreuses choses intéressantes sont observées. En effet, il semblerait que

l'obésité aurait un impact sur les cellules iNKT. Il est observé une réduction de leur nombre dans le sang périphérique d'obèse. Par ailleurs, l'obésité semble moduler l'expression d'une série de marqueurs membranaires retrouvés sur les cellules iNKT, tels que le CD69, le CD25, le CD161 et NKG2D. De plus, un impact de l'obésité sur la capacité des cellules iNKT à répondre à une stimulation est déjà observé. Ces différents résultats sont encourageant pour la suite, surtout que la cohorte n'étant pas encore finie. D'autres phénomènes vont probablement se dégager lors de la finalisation de celle-ci.

Bibliographie

1. OMS. Obesity-and-Overweight @ Www.Who.Int. *Organ Mund la Salud*. 2018;1. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Engin AB, Engin A. Obesity and Lipotoxicity. 2017;960. doi:10.1007/978-3-319-48382-5
3. Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother*. 2021;137(January):111315. doi:10.1016/j.biopha.2021.111315
4. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*. 2017;10(3):207-215. doi:10.1159/000471488
5. Vecchié A, Dallegri F, Carbone F, et al. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *Eur J Intern Med*. 2018;48(August 2017):6-17. doi:10.1016/j.ejim.2017.10.020
6. Conway B, Rene A. Obesity as a disease: No lightweight matter. *Obes Rev*. 2004;5(3):145-151. doi:10.1111/j.1467-789X.2004.00144.x
7. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2595-2600. doi:10.1210/jc.2004-0372
8. Metabolic-Syndrome @ Www.Nhlbi.Nih.Gov. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/metabolic-syndrome>.
9. Elabbassi WN, Haddad HA. The epidemic of the metabolic syndrome. *Saudi Med J*. 2005;26(3):373-375.
10. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018;36(1):14-20. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004
11. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867. doi:10.1038/nature05485
12. Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. *Adv Nutr*. 2016;7(1):66-75. doi:10.3945/an.115.010207
13. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7):s176-s185.
14. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-298. doi:10.1038/s41574-019-0176-8
15. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11:421-449. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044359
16. Khaodhiar L, McCowen KC, Blackburn GL. Obesity and its comorbid conditions. *Clin Cornerstone*. 1999;2(3):17-31. doi:10.1016/S1098-3597(99)90002-9
17. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017;389(10085):2239-2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2
18. Beulens JWJ, Rutters F, Rydén L, et al. Risk and management of pre-diabetes. *Eur J Prev Cardiol*. 2019;26(2_suppl):47-54. doi:10.1177/2047487319880041
19. Zand A, Ibrahim K, Patham B. Prediabetes: Why Should We Care? *Methodist Debaquey Cardiovasc J*. 2018;14(4).
20. Buyschaert M, Medina JL, Bergman M, Shah A, Lonier J. Prediabetes and associated disorders. *Endocrine*. 2015;48(2):371-393. doi:10.1007/s12020-014-0436-2
21. Khan RMM, Chua ZY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From pre-diabetes to diabetes: Diagnosis, treatments and translational research. *Med*. 2019;55(9):1-30. doi:10.3390/medicina55090546
22. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/291546
23. Hopkins BD, Goncalves MD, Cantley LC. Obesity and cancer mechanisms: Cancer metabolism. *J Clin Oncol*. 2016;34(35):4277-4283. doi:10.1200/JCO.2016.67.9712
24. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201
25. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1191-1197. doi:10.1038/ni1276
26. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm*. 2010;2010(Atp Iii). doi:10.1155/2010/289645
27. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-1119. doi:10.1172/jci25102
28. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141-150. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006
29. Lydia Lynch, Michael Nowak, Bindu Varghese, Justice Clark AEH, Toxavidis V, Balk SP, Shea DO, Farrelly CO, Exley MA. Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect Against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder Through Regulatory Cytokine Production. *Immunity*. 2016;37(3):574-587. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.016.Adipose
30. Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev*. 2021;37(2). doi:10.1002/dmrr.3377
31. Milner JJ, Beck MA. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(2):298-306. doi:10.1017/S0029665112000158
32. Michelet X, Dyck L, Hogan A, et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol*. 2018;19(12):1330-1340. doi:10.1038/s41590-018-0251-7
33. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*. 2012;13(8):707-712. doi:10.1038/ni.2343
34. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711

35. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: An innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):101-117. doi:10.1038/nri3369
36. Van Kaer L, Parekh V V., Wu L. Invariant natural killer T cells: Bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):43-55. doi:10.1007/s00441-010-1023-3
37. Wang Q, Wu H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. *Front Immunol.* 2018;9(October):2509. doi:10.3389/fimmu.2018.02509
38. Crosby CM, Kronenberg M. Tissue specific functions of invariant NKT cells. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139-148. doi:10.1038/s41577-018-0034-2.Tissue-specific
39. Kuylensstierna C, Björkström NK, Andersson SK, et al. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):1913-1923. doi:10.1002/eji.200940278
40. Reilly EC, Wands JR, Brossay L. Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine.* 2010;51(3):227-231. doi:10.1016/j.cyto.2010.04.016
41. Chandra S, Kronenberg M. *Activation and Function of INKT and MAIT Cells.* Vol 127. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/bs.ai.2015.03.003
42. Brailey PM, Lebrusant-Fernandez M, Barral P. NKT cells and the regulation of intestinal immunity: a two-way street. *FEBS J.* 2020;287(9):1686-1699. doi:10.1111/febs.15238
43. Tyznik AJ, Tupin E, Nagarajan NA, Her MJ, Benedict CA, Kronenberg M. Cutting Edge: The Mechanism of Invariant NKT Cell Responses to Viral Danger Signals. *J Immunol.* 2008;181(7):4452-4456. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4452
44. Anderson CK, Reilly SP, Brossay L. The Invariant NKT Cell Response Has Differential Signaling Requirements during Antigen-Dependent and Antigen-Independent Activation. *J Immunol.* 2021;206(1):132-140. doi:10.4049/jimmunol.2000870
45. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: An in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods.* 2004;293(1-2):127-142. doi:10.1016/j.jim.2004.07.006
46. Krovi SH, Gapin L. Invariant natural killer T cell subsets-more than just developmental intermediates. *Front Immunol.* 2018;9(JUN):1-17. doi:10.3389/fimmu.2018.01393
47. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(8). doi:10.1371/journal.ppat.1002838
48. Kinjo Y, Takatsuka S, Kitano N, et al. Functions of CD1d-restricted invariant natural killer T cells in antimicrobial immunity and potential applications for infection control. *Front Immunol.* 2018;9(JUN):1-8. doi:10.3389/fimmu.2018.01266
49. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, et al. Critical role of V α 14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol.* 2003;33(12):3322-3330. doi:10.1002/eji.200324254
50. Tsumoto N, Kinjo Y, Kitano N, et al. Exacerbation of invasive candida albicans infection by commensal bacteria or a glycolipid through IFN- Produced in part by iNKT cells. *J Infect Dis.* 2014;209(5):799-810. doi:10.1093/infdis/jit534
51. Gonzalez-Aseguinolaza G, Van Kaer L, Bergmann CC, et al. Natural killer T cell ligand α -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med.* 2002;195(5):617-624. doi:10.1084/jem.20011889
52. Khan A, Singh S, Galvan G, Jagannath C, Sastry KJ. Prophylactic sublingual immunization with Mycobacterium tuberculosis subunit vaccine incorporating the natural killer T cell agonist alpha-galactosylceramide enhances protective immunity to limit pulmonary and extra-pulmonary bacterial burden in mice. *Vaccines.* 2017;5(4):1-13. doi:10.3390/vaccines5040047
53. Novak J, Lehuen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine.* 2011;53(3):263-270. doi:10.1016/j.cyto.2010.11.001
54. Van Kaer L, Wu L. Therapeutic potential of invariant natural killer T cells in autoimmunity. *Front Immunol.* 2018;9(MAR):1-7. doi:10.3389/fimmu.2018.00519
55. Tard C, Rouxel O, Lehuen A. Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. *Biomed J.* 2015;38(6):484-495. doi:10.1016/j.bj.2015.04.001
56. Wolf BJ, Choi JE, Exley MA. Novel approaches to exploiting invariant NKT cells in cancer immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9(MAR). doi:10.3389/fimmu.2018.00384
57. Fujii SI, Shimizu K. Immune Networks and Therapeutic Targeting of iNKT Cells in Cancer. *Trends Immunol.* 2019;40(11):984-997. doi:10.1016/j.it.2019.09.008
58. Bae EA, Seo H, Kim IK, Jeon I, Kang CY. Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Arch Pharm Res.* 2019. doi:10.1007/s12272-019-01139-8
59. Giaccone G, Punt CJA, Ando Y, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide (KR7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2002;8(12):3702-3709.
60. Lynch L, Michelet X, Zhang S, et al. Regulatory iNKT cells lack PLZF expression and control Treg cell and macrophage homeostasis in adipose tissue. *Nat Immunol.* 2015;16(1):85-95. doi:10.1038/ni.3047.Regulatory
61. Lynch L, O'Shea D, Winter DC, Geoghegan J, Doherty DG, O'Farrelly C. Invariant NKT cells and CD1d+ cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur J Immunol.* 2009;39(7):1893-1901. doi:10.1002/eji.200939349

62. Lynch L. Adipose invariant natural killer T cells. *Immunology*. 2014;142(3):337-346. doi:10.1111/imm.12269
63. Bonamichi BDSF, Lee J. Unusual suspects in the development of obesity-induced inflammation and insulin resistance: NK cells, iNKT cells, and ILCs. *Diabetes Metab J*. 2017;41(4):229-250. doi:10.4093/dmj.2017.41.4.229
64. López S, García-Serrano S, Gutierrez-Repiso C, et al. Tissue-Specific Phenotype and Activation of iNKT Cells in Morbidly Obese Subjects: Interaction with Adipocytes and Effect of Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2018;28(9):2774-2782. doi:10.1007/s11695-018-3215-y
65. Yona S, Jung S. Monocytes: Subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(1):53-59. doi:10.1097/MOH.0b013e3283324f80
66. Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The ontogeny of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2019;10(JULY). doi:10.3389/fimmu.2019.01642
67. Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C, et al. Human Blood Monocyte Subsets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(8):1548-1558. doi:10.1161/atvbaha.117.309145
68. Boyette LB, MacEdo C, Hadi K, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*. 2017;12(4):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0176460
69. Jakubzick C V., Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(6):349-362. doi:10.1038/nri.2017.28
70. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1-10. doi:10.3390/ijms18071545
71. Thapa B, Lee K. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep*. 2019;52(6):360-372. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.6.140
72. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-964. doi:10.1038/nri1733
73. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-592. doi:10.1189/jlb.0806510
74. Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand J Immunol*. 2020;92(1):1-13. doi:10.1111/sji.12883
75. Poitou C, Dalmás E, Renovato M, et al. CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: Relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2322-2330. doi:10.1161/ATVBAHA.111.230979
76. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:439-456. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053119
77. Devèvre EF, Renovato-Martins M, Clément K, Sautès-Fridman C, Cremer I, Poitou C. Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity. *J Immunol*. 2015;194(8):3917-3923. doi:10.4049/jimmunol.1402655
78. Wong KL, Tai JJY, Wong WC, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-e31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
79. Kullo IJ, Hensrud DD, Allison TG. Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, ≥30). *Am J Cardiol*. 2002;89(12):1441-1443. doi:10.1016/S0002-9149(02)02366-4
80. Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, et al. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: Effect of pioglitazone. *Diabetes Care*. 2010;33(1):2010. doi:10.2337/dc09-1315
81. Resende DP, da Costa AC, de Souza Rosa LP, et al. Non-classical circulating monocytes in severe obesity and obesity with uncontrolled diabetes: A comparison with tuberculosis and healthy individuals. *Tuberculosis*. 2019;114:30-41. doi:10.1016/j.tube.2018.11.003
82. Chaudhry MS, Karadimitris A. Role and regulation of CD1d in normal and pathological B cells. *J Immunol*. 2014;193(10):4761-4768. doi:10.4049/jimmunol.1401805.Role
83. Moody DB, Cotton RN. Four pathways of CD1 antigen presentation to T cells. *Curr Opin Immunol*. 2017;46(Dc):127-133. doi:10.1016/j.coi.2017.07.013
84. Girardi E, Zajonc DM. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol Rev*. 2012;250(1):167-179. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01166.x
85. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: How it works. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):929-941. doi:10.1038/nri2191
86. Jayawardena-Wolf J, Benlagha K, Chiu YH, Mehr R, Bendelac A. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity*. 2001;15(6):897-908. doi:10.1016/S1074-7613(01)00240-0
87. McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. CD1d-dependent endogenous and exogenous lipid antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2015;34:116-125. doi:10.1016/j.coi.2015.03.004
88. Kharkwal SS, Arora P, Porcelli SA. Glycolipid activators of invariant NKT cells as vaccine adjuvants. *Immunogenetics*. 2016;68(8):597-610. doi:10.1007/s00251-016-0925-y
89. Kang SJ, Cresswell P. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol*. 2004;5(2):175-181. doi:10.1038/ni1034
90. McAdams MA, Van Dam RM, Hu FB. Comparison of self-reported and measured BMI as correlates of disease markers in U.S. adults. *Obesity*. 2007;15(1):188. doi:10.1038/oby.2007.504
91. Aronson D, Bartha P, Zinder O, et al. Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes*. 2004;28(5):674-679. doi:10.1038/sj.ijo.0802609
92. Pecht T, Gutman-Tirosh A, Bashan N, Rudich A. Peripheral blood leucocyte subclasses as potential biomarkers of

- adipose tissue inflammation and obesity subphenotypes in humans. *Obes Rev.* 2014;15(4):322-337. doi:10.1111/obr.12133
93. Kis J, Engelmann P, Farkas K, et al. Reduced CD4⁺ subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):654-662. doi:10.1189/jlb.1106654
 94. Antas PRZ, Oliveira EB, Milagres AS, et al. Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(8):1097-1099. doi:10.1590/S0074-02762002000800005
 95. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med.* 2013;19(10):625-632. doi:10.1016/j.molmed.2013.07.006
 96. O'Rourke RW, Gaston GD, Meyer KA, White AE, Marks DL. Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism.* 2013;62(11):1557-1561. doi:10.1016/j.metabol.2013.07.011
 97. Chung JJ, Markiewicz MA, Polić B, Shaw AS. Role of NKG2D in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *PLoS One.* 2014;9(10):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0110108
 98. Erkers T, Xie BJ, Kenyon LJ, et al. High-parametric evaluation of human invariant natural killer T cells to delineate heterogeneity in allo- And autoimmunity. *Blood.* 2020;135(11):814-825. doi:10.1182/BLOOD.2019001903
 99. Wang H, Feng D, Park O, Yin S, Gao B. Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: Opposite regulation by IL-4 and IFN- γ . *Hepatology.* 2013;58(4):1474-1485. doi:10.1002/hep.26471
 100. Iyoda T, Ushida M, Kimura Y, et al. Invariant NKT cell anergy is induced by a strong TCR-mediated signal plus co-stimulation. *Int Immunol.* 2010;22(11):905-913. doi:10.1093/intimm/dxq444
 101. Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010;31(3):369-376. doi:10.1093/eurheartj/ehp308
 102. Friedrich K, Sommer M, Strobel S, et al. Perturbation of the monocyte compartment in human obesity. *Front Immunol.* 2019;10(AUG):1-10. doi:10.3389/fimmu.2019.01874
 103. Huh JY, Park YJ, Kim JB. Adipocyte CD1d determines adipose inflammation and insulin resistance in obesity. *Adipocyte.* 2018;7(2):129-136. doi:10.1080/21623945.2018.1440928
 104. Huh JY, Park J, Kim JI, Park YJ, Lee YK, Kim JB. Deletion of CD1d in adipocytes aggravates adipose tissue inflammation and insulin resistance in obesity. *Diabetes.* 2017;66(4):835-847. doi:10.2337/db16-1122
 105. Hana Alzamil. Elevated Serum TNF- α Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes. *J Obes.* 2020;2020:5-9.

L'obésité est un problème de santé publique majeur entraînant une augmentation du risque de mortalité. Elle est associée au diabète de type 2, aux maladies cardio-vasculaires, mais aussi à certains types de cancers. De plus, l'obésité affecte différentes populations de cellules immunitaires, telles que les cellules NK, pouvant mener à une perte d'immuno-surveillance. L'hypothèse sur laquelle se base ce travail est que la présentation d'un nouvel antigène (glyco)lipidique via le CD1d par les monocytes des patients obèses intolérants au glucose pourrait induire une activation chronique et/ou robuste des cellules iNKT périphériques, conduisant à leur « épuisement » et contribuant à la perte d'immuno-surveillance observée chez les patients obèses. Dans ce mémoire, nous avons initié une étude clinique sur patient afin de caractériser les cellules iNKT ainsi que les monocytes de patients minces, obèses normoglycémiques et obèses intolérants au glucose. Différents phénomènes, ont dès lors, déjà pu être observés, telle qu'une diminution du nombre de cellules iNKT chez les patients obèses en comparaison aux patients minces. De plus, ces cellules iNKT de patients obèses auraient une moins bonne capacité à répondre à une stimulation par rapport à des cellules iNKT de patients minces. Nous avons observé que l'obésité pouvait avoir un impact sur le phénotype ainsi que sur les fonctions des cellules iNKT.

Obesity is a major public health problem leading to an increased risk of mortality. It is associated with type 2 diabetes, cardiovascular diseases, but also certain types of cancer. Additionally, obesity affects different populations of immune cells, such as NK cells, which can lead to loss of immune surveillance. The hypothesis on which this work is based is that the presentation of a new (glyco)lipid antigen via CD1d by the monocytes of obese glucose-intolerant patients could induce a chronic and/or robust activation of peripheral iNKT cells, leading to their "depletion". And contributing to the loss of immunosurveillance observed in obese patients. In this work, we initiated a clinical study on patients in order to characterize iNKT cells as well as monocytes from thin, obese normoglycemic and obese patients with intolerance to glucose. Various phenomena have already been observed, such as a decrease in the number of iNKT cells in obese patients compared to thin patients. In addition, these iNKT cells from obese patients would have a poorer ability to respond to stimulation compared to iNKT cells from thin patients. We observed that obesity could impact the phenotype as well as the functions of iNKT cells.